

**Herstellung monoklonaler Antikörper des Menschen:
Etablierung eines Systems zur Fusion von B-Lymphozyten**

vorgelegt von
Christian Reiter

*Diss
München
1985*

Aus dem Institut für Immunologie der Universität München

Vorstand : Prof. Dr. G. Riethmüller

Herstellung monoklonaler Antikörper des Menschen :
Etablierung eines Systems zur Fusion von B-Lymphozyten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christian Reiter

aus
München

Jahr
1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. G. Riethmüller

Mitberichterstatter :

Dekan : PROF. DR. W. SPANN

Tag der mündlichen Prüfung : 3.10.85

Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung	1
2.	Material und Methoden	2
2.1.	Umgang mit Zellkulturen	2
2.1.1.	Die wichtigsten Medien	2
2.1.2.	Wiederkehrende Arbeiten mit Zellkulturen	4
2.1.3.	Klonieren	6
2.1.4.	Feeder Layer	8
2.2.	Die humane Fusion	9
2.2.1.	Die Gewinnung fusionabler B-Zellen aus Blut	10
2.2.2.	Gewinnung fusionabler B-Lymphozyten aus einem Milzteil	14
2.2.3.	Leukämiezellen für die Zellfusion	15
2.2.4.	Als Fusionspartner geeignete Zelllinien	15
2.2.5.	Die Zellfusion	16
2.3.	ELISA (Enzym linked immuno sorbent assay)	18
2.4.	Chromosomenanalyse	19
2.5.	SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgel-Elektrophorese)	21
2.6.	Doppelimmundiffusion	24
3.	Ergebnisse	26
3.1.	Maßnahmen, um die Fusionsfrequenz zu erhöhen	26
3.1.1.	Verwendung von Feeder Layern	26
3.1.1.1.	Konditionierte Medien und Feeder Layer unter limitin g Dilution	26
3.1.1.2.	Feeder Layer bei Fusionen	32
3.1.2.	Einfluß der FCS-Charge	32
3.1.3.	Vergleich von Humanserum und fetalem Kälberserum	36
3.1.4.	Vergleich verschiedener Selektionsmedien	36
3.1.5.	Modifikationen des Fusionsprotokolls und ihr Einfluß auf die Fusionsfrequenz	39
3.1.5.1.	Wann soll das Selektionsmedium zugegeben werden	39

3.1.5.2.	Wie lange sollen die B-Zellen stimuliert werden ?	40
3.1.6.	Wie hoch ist die erreichte Fusionsfrequenz?	41
3.2.	Eigenschaften der human-humanen Hybridome	43
3.3.	Charakterisierung des produzierten Immunglobulins	51
3.3.1.	SDS-PAGE	51
3.3.2.	Doppelimmundiffusion	53
3.4.	Kurzprotokolle der erfolgreich durchgeführten Fusionen	55
4.	Diskussion	61
4.1.	Verfahren zur Herstellung humaner monoklonaler Antikörper	61
4.1.1.	Alternativen zur Human-humanen Zellfusion	62
4.1.2.	Mögliche Formen der humanen Fusion	64
4.2.	Etablierung eines humanen Fusionssystems	66
4.2.1.	Auswahl eines Fusionspartners	66
4.2.2.	Fusionable B-Lymphozyten	67
4.2.3.	Das Fusionsprotokoll	69
4.2.4.	Die Kulturbedingungen	73
4.2.4.1.	Feeder Layer und konditionierte Medien	73
4.2.4.2.	Auswahl des Serums	74
4.2.4.3.	Die Zelldichte	77
4.2.4.4.	Die Wahl des Selektionsmediums, HAT oder HAZA	77
4.2.4.5.	Zugabe des selektiven Mediums	83
4.3.	Eigenschaften des Fusionssystems	84
4.3.1.	Nicht-Hybridomlinien, Nachweis der Hybrid- natur	84
4.3.2.	Die Fusionsfrequenz	86
4.3.3.	Wachstum und Stabilität	88
4.4.	Charakterisierung des produzierten Immunglobulins	90
4.5.	Die Aussichten	91
5.	Zusammenfassung	93
6.	Literaturverzeichnis	97
7.	Lebenslauf	107

1. Einführung

Die Verwendung monoklonaler Antikörper hat in der Biologie und in der medizinischen Forschung große Fortschritte gebracht und neue Möglichkeiten eröffnet.

Die von Milstein und Köhler erarbeitete Technik, Maus-Myelomzellen mit Maus-B-Lymphozyten zu fusionieren und so Antikörper produzierende Zelllinien mit unbegrenzter Lebensdauer zu erhalten, ermöglicht die Herstellung von Antikörpern in beliebiger Menge. Ihre Spezifität ist eindeutig und stets gleichbleibend im Gegensatz zu den bis dahin ausschließlich verwandten Antisera.

Doch auch mit dieser Technik bereitet es große Schwierigkeiten, Antikörper gegen allotypische Determinanten auf menschlichen Zellen zu gewinnen, wie zum Beispiel HLA-Antigene oder tumorspezifische Antigene. Möglicherweise werden sie wegen der großen Zahl xenogener Strukturen auf menschlichen Zellen seltener von Maus-monoklonalen Antikörpern erkannt. Vielleicht gibt es auch Determinanten, die nur von menschlichen Lymphozyten erkannt werden. Maus-monoklonale Antikörper sind auch nur bedingt therapeutisch einsetzbar, weil in stärkerem Maß mit allergischen Reaktionen zu rechnen ist.

Mit einem Verfahren human-humane-Hybridome zu erzeugen wären diese Probleme zum Teil leichter zu lösen. Außerdem ergäben sich neue Aspekte in der Erforschung von Autoimmunerkrankungen, Kollagenosen und Transplantatabstoßungsreaktionen.

In der vorgelegten Arbeit versuche ich aufzuzeigen, welche Bedingungen erfüllt sein müssen in dem empfindlichen System der humanen Fusion, um human-humane Hybride zu etablieren, die immunologisch und serologisch definierte monoklonale Antikörper produzieren.

2. Material und Methoden

2.1. Umgang mit Zellkulturen

2.1.1. Die wichtigsten Medien

Als Kulturmedium wird im folgenden RPMI 1640 bezeichnet mit den Zusätzen:

1 x = 2 mM L-Glutamin (Originallösung 100 x)

2 x = 200 U Penicillin-Streptomycin
(Originallösung 10000 U)

2 x = NEAA (nicht essentielle Aminosäuren,
Originallösung 100 x)

20 % inaktiviertes FCS (fetales Kälberserum)

Fertiges Medium wurde bei -20° C aufbewahrt, aufgetautes Medium innerhalb weniger Tage aufgebraucht.

Für Massenkulturen in großen Plastikflaschen wurde der FCS-Anteil auf 10 % reduziert.

RPMI 1640 (Gibco, 430-1800)

L-Glutamin 100 x (Gibco 043-5030) wurde in
Aliquoten bei -20° C aufbewahrt.

Penicillin-Streptomycin 100 x (Gibco 043-5140)

Aliquote wurden bei -20° C eingefroren.

NEAA 100 x (Gibco 043-1140) wurde bei 4° C im
Kühlraum aufbewahrt.

FCS (Gibco, U 814-701 N) wurde durch 45-minütiges Erhitzen im Wasserbad auf 56° C inaktiviert und in Aliquoten eingefroren bei -20° C aufbewahrt.

In einigen Experimenten wurde statt FCS dem Medium HS (Humanserum) zugesetzt.

Humanserum

Blut von 4 oder 5 männlichen Spendern wird defibriniert und 15 Minuten bei 800 g zentrifugiert. Der Überstand wird vom Sediment abgehoben und durch ein Membranfilter mit 0,2 µm Porenweite filtriert. Anschließend wird es wie FCS inaktiviert und gelagert.

Selektive Medien

Durch die Substanzen Aminopterin bzw. Azaserin wird ein wichtiger Schritt in der Purinsynthese der Zellen gehemmt. Wird dem Medium Hypoxanthin und Thymidin bzw. nur Hypoxanthin zugesetzt, so können die Zellen mit Hilfe des Enzyms HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phospho-Ribosyl-Transferase) die Purine aus Hypoxanthin bilden. Zellen mit einem Mangel an diesem Enzym können in selektivem Medium nicht wachsen und sterben schließlich ab.

HAZA-Medium : Kulturmedium mit

1 x = 0,4 µg/ml	=	2,31 µM	Azaserin
1 x = 13,6 µg/ml	=	100,0 µM	Hypoxanthin

HAT-Medium : Kulturmedium mit

1 x = 0,176 µg/ml	=	0,4 µM	Aminopterin
2 x = 27,2 µg/ml	=	200 µM	Hypoxanthin
2 x = 7,76 µg/ml	=	32 µM	Thymidin

Die selektiven Medien wurden durch Zugabe von 100 x-Stammlösungen zu Kulturmedium hergestellt und in wenigen Tagen aufgebraucht. Alle Azaserin enthaltenden Medien und Lösungen wurden lichtgeschützt aufbewahrt.

Azaserin (Sigma 4142) : Die 1000 x Lösung der Substanz in Aqua bidest wurde in Aliquoten zu 1ml bei -20° C lichtgeschützt gelagert.

Aminopterin (Fluka, 09328)

Eine 1000 x Lösung der Substanz in Aqua bidest wurde in 1 ml Aliquoten bei -20° C eingefroren.

Hypoxanthin (Fluka, 6106)

Thymidin (Fluka, 89270)

Für die Herstellung der 100 x Lösungen von Hypoxanthin bzw. Hypoxanthin-Thymidin in Aqua bidest wurden einige Tropfen 1 N Natronlauge zugegeben und im Wasserbad auf 56° C erwärmt, um den Lösungsvorgang zu beschleunigen. Nach dem Sterilfiltrieren wurden die Lösungen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

100 x HAZA wurde aus 10 ml 100 x Hypoxanthin und 1 ml 1000 x Azaserin jede Woche frisch hergestellt und dunkel bei 4° C aufbewahrt.

100 x HAT aus 20 ml 100 x Hypoxanthin-Thymidin und 1 ml 1000 x Aminopterin wurde im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt.

2.1.2. Wiederkehrende Arbeiten mit Zellkulturen

Alle Zellen werden in Brutschränken bei 37° C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 7 % CO_2 -Spannung inkubiert.

Füttern

Die Hälfte des verbrauchten Mediums wird entnommen und durch frisches, auf 37° C vorgewärmtes Kulturmedium ersetzt. Die Zeitabstände werden nicht im voraus festgelegt, sondern es wird beim Durchsehen der Kulturen nach der Farbe des Mediums, der Zelldichte und nach dem Aussehen der Kulturen unter dem umgekehrten Phasenkontrastmikroskop entschieden, wann erneut gefüttert werden soll.

Zählen

Die Zellen werden gleichmäßig in ihrem Medium resuspendiert und ein bestimmtes Volumen entnommen. Je nach Zelldichte müssen die Zellen noch verdünnt oder konzentriert werden. Der Verdünnungs- bzw. Konzentrationsfaktor ist dann bei der Berechnung zu berücksichtigen. Dann wird mit einer Trypan-blau-Lösung 1:2 verdünnt, gut gemischt und mit einer Neubauer-Zählkammer und dem Phasenkontrastmikroskop die Zelldichte ausgezählt. Lebende Zellen bleiben ungefärbt, während tote dunkelblau sind. Die Gesamtzahl ergibt sich aus der gezählten Zellzahl, (mindestens 100) der Zahl der ausgezählten Quadrate, den Verdünnungsfaktoren einschließlich der Verdünnung mit Farbstoff und dem Gesamtvolumen der Zellsuspension.

Trypan-blau-Lösung : 0,04 % Trypanblau in 0,9 % Kochsalz-Lösung

Waschen

Dies geschieht, um Mediumbestandteile oder Zelltrümmer zu entfernen. Die Zellen werden hierzu mehrfach in PBS mit 2,5 % FCS resuspendiert und 10 Minuten mit 400 g abzentrifugiert. Der Überstand wird abgesssen oder mit der Pipette abgehoben. Das Pellet wird vorsichtig im letzten Flüssigkeitstropfen resuspendiert und dann mit neuem Medium aufgefüllt.

FBS : 50,6 g Na_2HPO_4

+12,17 g KH_2PO_4

+21,92 g NaCl

auf 5000 ml mit Aqua bidest aufgefüllt und autoklaviert.

Einfrieren

Die Zellen werden gezählt und auf die Hälfte des gewünschten Volumens mit kaltem Kulturmedium eingestellt. Im Eisbad können sie so mehrere Stunden aufbewahrt werden.

Kurz vor dem Einfrieren wird die selbe Menge eiskalten Einfriermediums, das ist Kulturmedium mit 20 % FCS und 20 % DMSO (Dimethylsulfoxid, Merck 2931) tropfenweise unter Schütteln im Eisbad zugegeben. Hiernach werden die Zellen a 1 ml in Kryoröhrchen aliquotiert und entweder in der Einfriermaschine kontrolliert eingefroren oder in Isoliermaterial verpackt in der -80°C Kühltruhe. Die Lagerung erfolgt in flüssigem Stickstoff. DMSO soll beim Einfriervorgang die Schädigungen durch sich bildende Kristalle vermindern.

Auftauen

Das Auftauen wird im 37°C Wasserbad vorgenommen, bis sich nur noch wenig Eis im Einfrieröhrchen befindet. Die Zellen werden in ein 15 ml Plastikzentrifugenöhrchen überführt, das tropfenweise mit kaltem Kulturmedium aufgefüllt wird. Dann wird sieben Minuten bei 400 g zentrifugiert und noch zweimal mit kaltem Kulturmedium gewaschen. Nach der Zählung wird die gewünschte Konzentration mit warmem Kulturmedium eingestellt und die Zellen in einer der Menge entsprechenden Kulturflasche aufgenommen.

2.1.3. Klonieren

Sind in einer Kultur Zellen mit verschiedenen Eigenschaften und Wachstumsgeschwindigkeiten, so verdrängen die schneller wachsenden oder widerstandsfähigeren die übrigen Teilpopulationen. Erwünschte Eigenschaften wie Immunglobulinsekretion können so verloren gehen.

Werden nun aus einzelnen Zellen getrennt neue Zellstämme herangezogen, dann können ihre Eigenschaften untersucht, und gezielt die Klone mit den erwünschten Fähigkeiten weiter kultiviert werden. Alle Zellen eines Klonstammes stammen von der selben Einzelzelle ab, sind also genetisch und in ihren

Eigenschaften identisch, solange nicht erneut eine Mutation auftritt, oder eine Zelle Chromosomen ausschleust.

Limiting Dilution

Bei diesem Klonierungsverfahren wird folgendermaßen vorgegangen: Die zu klonierende Zellkultur wird gründlich resuspendiert und die Zelldichte ermittelt. Danach bestimmt sich das Verdünnungsverhältnis, um eine Einzelzellsuspension mit 10 Zellen je ml Kulturmedium zu erhalten. Es sind mehrere Verdünnungsschritte notwendig, und jedesmal muß gründlich gemischt werden. Deshalb weicht die tatsächliche Dichte lebender Zellen von der angestrebten oft deutlich ab. Zur Kontrolle wird deshalb erst eine Reihe einer 96-Loch-Mikrotiterplatte (Nunc, 167008) mit 100 µl je Loch gefüllt und nach einigen Minuten, wenn die Zellen zum Boden gesunken sind, unter dem Mikroskop nachgezählt. Angestrebt wird eine Zelle je Loch. Grobe Fehler werden korrigiert und dann in alle Löcher einer Platte 100 µl eingefüllt. 100 µl einer Makrophagen- oder Fibroblastensuspension sind bereits am Vortag als Feeder Layer eingefüllt worden.

Nach 10 Tagen wird zum erstenmal gefüttert, dann jede Woche. Nach drei Wochen können Überstände getestet und Kulturen auf größere Wells übersiedelt werden.

Die Verteilung der Zellen auf die Löcher geschieht zufällig und entspricht der Poisson-Verteilung.

$$u = -\ln(1-n), \quad n = 1-e^{-u}$$

n: Anteile der Löcher mit einer oder mehreren Zellen.

u: ausgesäte Zellen geteilt durch die Zahl der gefüllten Löcher.

Aus wievielen Zellen sich Kolonien entwickeln hängt ab von der Vitalität der Zellen und den Kulturbedingungen. Ein Maß für die Güte der Kulturbedingungen für eine Zelllinie unter Limiting Dilution bei konstanter Zellzahl je Loch ist die KE (Kloning Efficiency):

$$KE = \frac{\text{Gesamtzahl der Löcher}}{\text{Löcher mit Kolonien, nach 3 Wochen.}}$$

Je höher die KE, desto besser sind die Kulturbedingungen.

2.1.4. Feeder Layer

Wie schon kurz erwähnt, läßt sich die KE, aber auch das Ergebnis bei Fusionsexperimenten, durch die gleichzeitige Kultivierung anderer Zellen deutlich verbessern. Solche als Feeder Layer bezeichneten Zellen scheinen durch Konditionierung des Mediums und der Kulturgefäßwände das Wachstum zu erleichtern. Makrophagen können darüber hinaus tote Zellen aus der Kultur entfernen.

PEC (Peritoneal-Exsudat-Zellen) als Feeder Layer:

Sie werden von Balb/c Mäusen gewonnen und bestehen vorwiegend aus Makrophagen sowie einigen Lymphozyten und Fibroblasten. Zur Präparation von PEC werden jeweils mindestens drei Mäuse getötet, und das Fell vom Rumpf entfernt. Dann wird in die Bauchhöhle ca. 12 ml kaltes RMI 1640 injiziert und wieder abgezogen. Nach 10 Minuten abzentrifugieren bei 400 σ werden die Zellen in warmem Kulturmedium auf die gewünschte Zelldichte eingestellt. Für die Verwendung in 24 Well Makrotiterplatten (Costar, 3524, Cambridge, USA) werden $5 \cdot 10^4$ Zellen und 1 ml in die Löcher gefüllt. Für Mikrotiterplatten wird auf $1 \cdot 10^5$ /ml eingestellt, und es werden 100 μ l eingefüllt.

GM 730 (Humane Fibroblasten)

Sie werden in Plastikkulturflaschen gezogen, ein- bis zweimal wöchentlich gefüttert und alle zwei bis drei Wochen passagiert. Dazu wird von den konfluenten Kulturen das Medium vollständig abgegossen und 10 ml von 2 mM EDTA in PBS zugegeben, das auf 37° C vorgewärmt ist. Dadurch werden freie Kalziumionen gebunden, die Zellen lösen sich von der Plastikoberfläche und runden sich ab. Nach 5 Minuten im Brutschrank lassen sich die letzten anhaftenden Zellen abklopfen. Die Zellsuspension wird in ein Zentrifugenröhrchen refüllt und 10 Minuten mit 400 g zentrifugiert. Das Pellet wird im letzten Tropfen resuspendiert und in frischem Kulturmedium auf zwei bis vier neue Kulturflaschen verteilt.

Als Feeder Layer wurden GM 730 zwischen der 10. und 20. Passage benützt. Die Zellen einer konfluent bewachsenen 75 cm² Kulturflasche wurden auf vier Makro- oder Mikrotiterplatten verteilt mit 1 ml bzw. 0,1 ml Medium je Loch. Mit den eigentlichen Kulturen wurde dann am nächsten oder übernächsten Tag begonnen.

FCH-1D5 (erhalten von Dr. Hinrich Peters, Köln)

Dies ist eine adhärent wachsende Maus-Maus-Hybridzelllinie mit guten Feeder-Eigenschaften. Sie wurde wie GM 730 kultiviert und als Feeder Layer eingesetzt.

2.2. Die Human-Humane Fusion

Eine menschliche lymphoblastoide B-Zelllinie, die an die Zellkultur angepasst ist, und der das Enzym HGPRT fehlt, wird mit Hilfe von PEG (Polyethylen glycol) mit stimulierten menschlichen B-Lymphozyten zur Verschmelzung gebracht. Die so entstehenden Hybridomzellen enthalten das genetische Material beider Elternzellen und sollten somit in der Lage sein, in selektivem Medium zu wachsen, sich in Zellkultur unbegrenzt zu teilen und das vom B-Lymphozyten determinierte menschliche Immunglobulin zu bilden.

Milz und Lymphknoten, Gewebe, die viele B-Lymphozyten enthalten, können nur ausnahmsweise benützt werden. Deshalb wurden die Lymphozyten für die meisten Experimente aus venösem Blut gewonnen. Der Anteil der B-Lymphozyten ist dabei aber relativ klein und es liegt wahrscheinlich eine andere Verteilung der B-Zell-Subpopulationen vor, als in der Milz oder in Lymphknoten.

2.2.1. Gewinnung fusionabler B-Zellen aus Blut

Blutentnahme

Von jungen männlichen Spendern werden in nüchternem Zustand 400 ml Blut aus einer Armvene entnommen. Die Gesamtmenge wird auf acht Plastikzentrifugenröhrchen aufgeteilt, die einige Glaskügelchen enthielten. Während 15minütigem Schütteln scheidet sich ein weißer Thrombus ab, der einen Großteil der Blutplättchen und viele Monozyten enthält, aber nur wenige andere Zellen. Dann wird 15 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Der Thrombus wird herausgenommen und das überstehende Serum mit einer Pipette abgesogen. Das Sediment wird gesammelt und mit PBS auf 800 ml aufgefüllt. Für die anschließende Dichtegradienten-Zentrifugation werden die Zellen erneut auf Zentrifugenröhrchen verteilt, und es wird jeweils 20 ml Ficoll 1077 unterschichtet.

Ficoll 1077: 38,72 g Ficoll 400
 in 500 ml Aqua bidest lösen, mit
 104,7 ml Urovision
 mischen und durch Filtrieren sterilisieren

Bereit durch den Kontakt mit dem Polysaccharid Ficoll agglutinieren die roten Blutkörperchen und sinken teilweise zum Boden. Nach 30 Minuten zentrifugieren mit 800 g sind alle Erythrozyten und Granulozyten zum Boden gesunken, während die PBM (mononukleäre Zellen des peripheren Bluts) eine milchige weiße Scheibe in der Grenzschicht bilden.

Diese Interphasen werden mit der Pipette abgesogen, und die Zellen dreimal mit PBS mit 2,5 % FCS gewaschen. Wegen des Ficoll-Gehaltes wird beim erstenmal mit 800 g zentrifugiert.

Zählen der Zellen

Es sind etwa 400 - 800 $\cdot 10^6$ PBM zu erwarten, etwa 1 % tote Zellen und etwa 2 % Erythrozyten.

E-Rosetting

T-Lymphozyten tragen Rezeptoren für SRBC (Schafserythrozyten). Werden sie zusammen geeignet inkubiert, so lagern sich SRBC in Form von Rosetten um die T-Zellen. Wird nun erneut über einen Ficoll-Dichtegradienten zentrifugiert, so werden die T-Zellen in den Rosetten mit in das Pellet gezogen, während B-Lymphozyten und Monozyten in der Interphase bleiben.

SRBC wurden 14-tägig frisch bezogen (Behring Werke AG). Durch eine Vorbehandlung mit AET (S-(2-Aminoethyl)-isothiuroniumbromid, Serva, 12350) haften die SRBC fester und die Trennung wird besser reproduzierbar.

AET-SRBC 5 % : 20 ml der SRBC-Suspension werden dreimal mit PBS bei 800 g gewaschen um die Aufbewahrungslösung zu entfernen. 1 g AET wird in 25 ml Aqua bidest gelöst und der pH-Wert mit 4 N Natronlauge auf pH 9 eingestellt. Diese 4 %ige Lösung wird sterilfiltriert. Zum Pellet mit den SRBC wird das drei- bis vierfache Volumen AET 4 % gegeben und resuspendiert. 10 Minuten wird im Wasserbad bei 37° C inkubiert, und in dieser Zeit mehrmals geschüttelt. Dann werden die SRBC sechs- bis achtmal mit PBS bei 800 g gewaschen, bis der Überstand nur mehr schwach rot gefärbt ist, und kaum noch Hämolyse auftritt. Die gepackten Erythrozyten werden dann 1:20 in Kulturmedium mit 10 % FCS aufgenommen. Diese AET-SRBC 5 %-Suspension wird bis zu einer Woche bei 4° C aufbewahrt.

Außerdem muß absorbiertes FCS bereitgestellt werden. Durch Absorbieren mit SRBC werden aus dem Serum Antikörper entfernt, die das Rosettieren behindern könnten.

Absorbiertes FCS

20 ml SRBC-Suspension werden dreimal bei 800 g mit PBS gewaschen. Die gepackten Zellen werden in 200 ml inaktivem FCS gründlich resuspendiert und dann 30 Minuten im Wasserbad bei 37° C inkubiert sowie weitere 30 Minuten im Eisbad. Die SRBC werden 20 Minuten bei 800 g abzentrifugiert, das Serum wird vorsichtig abgehoben und Aliquote bei -20° C aufbewahrt.

T-Zellseparation

In 50 ml Plastikzentrifugenröhrchen werden je $50 \cdot 10^6$ FBM mit 5 ml der 5 % AET-SRBC Suspension gemischt und 10 Minuten bei 800 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgessen und das Pellet in 4 ml absorbiertem FCS resuspendiert. Dann wird 5 Minuten bei 37° C im Wasserbad inkubiert und 5 Minuten mit 50 g zentrifugiert. Es folgt eine zweistündige Inkubation im Eisbad. Danach haben sich um die T-Zellen AET-SRBC zu Rosetten gelagert.

Das lockere Pellet wird durch vorsichtiges kippen gelöst und die Suspension wird mit 25 ml kaltem PBS verdünnt. Darunter werden vorsichtig 15 ml kaltes Ficoll 1077 geschichtet, dann wird 20 Minuten in der vorgekühlten Zentrifuge bei 800 g separiert.

Die Zellen der Interphase werden mit einer Pipette abgesehen und dreimal mit PBS mit 2,5 % FCS gewaschen. Der erste Waschgang geschieht wieder bei 800 g.

Der in den Zentrifugenröhrchen verbliebene Überstand wird abgessen, das Pellet wird im letzten Tropfen aufgeschüttelt und mit jeweils 1 ml Lysepuffer vermischt.

Lysepuffer: 8,3 g = 160 mM NH_4Cl ,
1,0 g = 10 mM KHCO_3 und
0,0372 g EDTA (Titriplex III)
auf 1000 ml mit Aqua bidest aufgefüllt, auf
pH 7,4 eingestellt und sterilfiltriert.

Die AET-SRBC platzen in dieser Lösung wegen ihrer geringeren Resistenz, und die T-Zellen werden aus den Rosetten freigesetzt.

Nach etwa 5 bis 10 Minuten wird mit PBS mit 2,5 % FCS aufgefüllt. Die Lösung ist nun fast klar und lackfarben von freigesetztem Hämoglobin. Auch die T-Zellen werden dreimal gewaschen, wobei sich fast immer Klümpchen aus stärker geschädigten Zellen bilden, Sie werden entfernt und bei der anschließenden Zellzählung nicht berücksichtigt. Nach der T-Zellseparation sind noch etwa 70 % der Ausgangszellzahl vorhanden, etwa ein Drittel ist in der B-Zellfraktion..

Diagnostischer Reinheitstest

Damit wird die Güte der Trennung überprüft. In zwei Eppendorf-Röhrchen kommen 10^6 Zellen der B- und T-Fraktion, dazu 300 μl absorbiertes FCS und 100 μl AET-SRBC. Die Ansätze werden 5 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert, 5 Minuten bei 50 g sedimentiert und über Nacht auf Eis gestellt. Am nächsten Tag wird das Pellet vorsichtig aufgeschüttelt, mit PBS verdünnt und eine Probe mit Kristallviolett gefärbt.

Zum Zählen wird mit einer Pasteur-Pipette ein Tropfen auf einen Objektträger gegeben und ein Deckglas aufgelegt. Lymphozyten, an die zwei oder mehr SRBC angelagert sind, werden als Rosetten gezählt.

Es sind etwa 80 bis 90 % rosettenbildende Zellen in der T-Fraktion zu erwarten und weniger als 5 % in der B-Fraktion.

B-Zellstimulation

Für die Untersuchungen kam es auf eine möglichst große Zahl fusionabler Zellen an, ohne Rücksicht auf ihre Antigen-spezifität. Daher wurde das T-Zell-abhängige B-Zell-Mitogen PWM (Pokeweed Mitogen) benutzt.

PWM: (Gibco, 670-5369), Lyophilisat in Aqua bidest gelöst, 1:10 mit PBS verdünnt, sterilfiltriert und 1 ml Aliquote bei -20°C aufbewahrt.

Die zur Stimulation der B-Zellen erforderlichen T-Zellen werden mit 3000 rad gamma-bestrahlt, eine Dosis, durch die die Proliferation der Zellen verhindert wird, und T-Suppressor Zellen selektiv geschädigt werden, so daß die T-Helfer Zellen voll zur Wirkung kommen.

Für einen Teil der Experimente wurde zusätzlich TT (Tetanus Toxoid) in einer unspezifisch mitogenen Konzentration zugegeben.

TT: (Behring Werke, 1 mg/ml, 0,2 % Azid) Das Azid wurde durch Dialyse entfernt und sterile 1 ml Aliquote bei -20°C eingefroren.

Zur Stimulation werden die B-Zellen und die bestrahlten T-Zellen wieder zusammengegeben, in Kulturmedium auf $2 \cdot 10^6$ Zellen je Milliliter eingestellt, und von PWM 10 $\mu\text{g/ml}$, von TT zusätzlich 1,0 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben. Diese Ansätze wurden in Plastikkulturflaschen gefüllt und 4 Tage im Brutschrank inkubiert.

2.2.2. Gewinnung fusionabler B-Lymphozyten aus einem Milzteil

Herr Dr. Welter stellte uns ein Stück einer Milz zur Verfügung, die einem Patienten mit einem subphrenischen Abs-

zeß entnommen worden war. Das Gewebe wurde in kaltem RPMI 1640 fein zerzupft und die Zellsuspension abgesogen. Nach dem Sedimentieren gröberer Teile wurden aus der überstehenden Zellsuspension die mononukleären Zellen über einen Dichtegradienten, wie die PBM aus dem Blut, abgetrennt. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen in Portionen zu $150 \cdot 10^6$ Zellen eingefroren.

Für Fusionsexperimente wurde eine entsprechende Menge aufgetaut. Ohne vorherige T-Zellseparation wurden die Zellen wie für die aus Blut gewonnenen beschrieben, 4 Tage stimuliert.

2.2.3. Leukämiezellen für die Zellfusion

Einem Patienten mit CLL (chronische lymphatische Leukämie) wurde vor Therapiebeginn Blut entnommen. Die Zählung ergab $200000/\text{mm}^3$ Leukozyten. Die CLL-Zellen wurden wie PBM separiert und in Aliquoten kontrolliert eingefroren. Aufgetaute Zellen wurden ohne Vorstimulation fusioniert.

2.2.4. Als Fusionspartner geeignete Zelllinien

Eine sinnvolle Zusammenarbeit der fusionierten Elternzellen ist wohl nur möglich, wenn auch die zellkulturadaptierte Linie aus der B-Zellreihe stammt. Sie sollte alle Organellen für die Antikörperproduktion enthalten, also bereits weit differenziert sein, andererseits selbst möglichst kein Immunglobulin produzieren, um das Screening und die spätere Reindarstellung des gesuchten Antikörpers zu erleichtern. Diese Eigenschaft haben wiederum die frühen Differenzierungsstufen der B-Zellen.

Leider steht für die humane Fusion noch keine Linie zur Verfügung mit ähnlich guten Eigenschaften wie zum Beispiel X63.Ag8.653 für die Maus-Fusion.

Man muß auf Plasmazelleukämielinien und LCL-Linien (Ep-

stein-Barr-Virus transformierte Zelllinien) zurückreifen, die selbst Immunglobulin in unterschiedlicher Menge produzieren. In dieser Arbeit werden zwei Zelllinien eingesetzt:

Lier-Lon-HMy2 ist eine von P. A. W. Edwards (15) etabliertes Derivat einer Plasmazelleukämie-Linie. Sie ist HGPRT-defizient und EBNA-positiv (Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen). Andere Autoren rechnen sie deshalb zu den LCL (28). Sie produziert γ_1K , in unseren Händen bis 200 ng/ml.

Wi-L2 729 HF₂ ist abgeleitet von einer 1968 von J. A. Levy (35) etablierten LCL. Der Klon Wi-L2 729 HF₂ ist HGPRT-defizient und auf hohe Fusionsraten hin selektiert. Er stammt aus dem Labor von R.L. Lundak, University of California, Riverside, CA. Die Zelle bildet weniger als 10 ng/ml IgG (55). Wi-L2 729 HF₂, im folgenden kurz Wi-L2 genannt, wurde für Fusionsexperimente benutzt.

Um HGPRT-positive Revertanten auszuschließen, werden diese Zelllinien alle zwei Monate für jeweils eine Woche in Kulturmedium mit 5 µg/ml 8-Azazuanin kultiviert (Fluka 11410). 8-Azazuanin wird als falsches Substrat vom Enzym HGPRT in den RNS-Stoffwechsel eingeschleust. Das Ablesen der m-RNS an den Ribosomen wird dadurch blockiert und Revertanten sterben dadurch ab.(18).

2.2.5. Die Zellfusion

Das Schema entspricht weitgehend dem im Labor von Frau Dr. J. Johnson an diesem Institut für die Maus-Fusion verwendeten. Je 24-Well Makrotiterplatte werden $10 \cdot 10^6$ stimulierte B-Zellen vorgesehen, das Verhältnis Wi-L2 zu B-Zellen liegt zwischen 1:2 und 1:5. Die Fusion wird mit 44 % PEG und 5 % DMSO durchgeführt. Es wird PEG 4000 für Gaschromatographie verwandt, da damit die besten Ergebnisse nach Fazekas (17)

zu erzielen sind. DMSO soll eventuell auftretende osmotische Effekte reduzieren.

PEG 4000 GK: (Merck, 9727) eine abgewogene Menge wurde autoklaviert, mit RPMI 1640 eine 50 %ige Lösung hergestellt, und 1 ml Aliquote bei -20 C eingefroren.

44 % PEG 5 % DMSO: unmittelbar vor der Fusion wurde 1 ml PEG 50 % aufgetaut und 250 µl einer 25 % Lösung von DMSO in RPMI 1640 zugegeben.

Vor der Fusion werden Wi-L2 und die stimulierten Zellen zweimal in serumfreiem RPMI 1640 gewaschen und gezählt. Unter den stimulierten Zellen waren zwischen 25 und 50 % Blasten. Als solche werden große Zellen, Zellen mit Ausläufern und birnenförmige Zellen gezählt.

Zu den stimulierten Zellen wird eine geeignete Menge Wi-L2 gegeben, gemischt und gemeinsam für 10 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wird gründlich abgesssen und auf das trockene Pellet über eine Minute 1 ml der auf 37° C vorgewärmten 44 % PEG 5 % DMSO Lösung zusetropft. Dabei werden die Zellen wieder resuspendiert. Sofort anschließend wird mit 150 g zentrifugiert für eine Minute, vom Erreichen der Solldrehzahl an gerechnet. Ohne Abgießen wird dann unter ständigem Schütteln 10 ml vorgewärmtes RPMI 1640 über fünf Minuten zusetropft, dann weitere 10 ml in kürzerer Zeit. Erneut wird sieben Minuten mit 400 g zentrifugiert, der Überstand abgesssen, und die Zellen in Kulturmedium verteilt. Davon wird je 1 ml in die Wells der vorbereiteten Makrotiterplatten mit Feeder Layern gefüllt.

Das selektive Medium wird entweder zugegeben, indem die Zellen nach der Fusion direkt in doppelt konzentriertes selektives Medium aufgenommen werden, oder, indem am ersten, zweiten und dritten Tag nach der Fusion die Hälfte des Mediums durch Selektionsmedium ersetzt wird. Später wird

wöchentlich gefüttert.

Dazwischen wird nur makroskopisch nach der Mediumfarbe und nach großen Zellkolonien gesehen, um Temperaturschwankungen und Veränderungen der CO_2 - Spannung möglichst klein zu halten.

2.3. ELISA (Enzyme linked immuno sorbent Assay)

Wenn in den Fusionsexperimenten in selektivem Medium Zellkolonien gewachsen waren, wurden die Überstände mit einem für menschliches Immunglobulin empfindlichen Enzym-immuno-Assay getestet.

Dabei wird eine 96-Loch Mikrotiterplatte (Nunc, 167008) mit Ziegen-anti-human-Immunglobulin beschichtet. das in den Überständen enthaltene Immunglobulin wird davon gebunden und im nächsten Arbeitsgang mit einem zweiten Ziegen-anti-human-Immunglobulin-Antikörper, an den das Enzym Peroxidase gekoppelt ist, markiert. Überschüssiger Antikörper wird ausgewaschen und die Lösung eines Substrats eingefüllt, das von der Peroxidase zu einem braunen Farbstoff umgesetzt wird. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird die Farbtintensität photometrisch bestimmt. Mit Hilfe einer Standardtitration läßt sich der Immunglobulingehalt der Proben halb-quantitativ bestimmen.

Die einzelnen Arbeitsgänge sind:

Beschichten : (coat) 100 μl /Loch Ziegenserum 1:750
in PBS einfüllen (27. Blutung der Ziege Liese nach Immunisierung mit human-IgG von 1976, Labor Prof. Riebel und eine Stunde bei RT (Raumtemperatur) inkubieren.
Für alle Inkubationen wird eine feuchte Kammer benutzt.
3 x Waschen mit PBS mit 0,05 % Tween 20 (Fluka, 93773)
Die Mikrotiterplatte wird dazu umgedreht und die Löcher mit einem Ruck entleert. Dann wird die Platte als ganze in der Waschflüssigkeit untergetaucht und die Löcher gefüllt.

Probenauftrag: Erste und zweite Reihe Nullwerte: 100 µl/Loch
PBS mit 10 % FCS, dritte und vierte Reihe: je 100 µl/Loch
human-IP Standardverdünnungen (Miles Laboratories,
82-310-2, 10 bis 10000 ng/ml in PBS mit 10 % FCS),
restliche Löcher je 100 µl der Proben.

Zwei Stunden Inkubation bei RT

5 x Waschen in PBS mit 0,05 % Tween 20

Entwickeln : Polyvalenter Peroxidase gekoppelter Ziege-anti-
human-Immunglobulin-Antikörper (Nordic 15.25) wird
1 : 6000 in PBS mit 10 % FCS verdünnt und je Loch 100 µl
eingefüllt, eine Stunde Bei RT inkubiert.

10 x Waschen mit PBS mit 0,05 % Tween 20

Färbung : Für die Substratlösung wird 25 mg o-Phenylendi-
amin (Sigma P-3888) in 25 ml Citratpuffer gelöst.

Citratpuffer : 7,355 g Citronensäure-1-hydrat und
19,12 g tri-Natriumcitrat auf
1000 ml mit Aqua bidest aufgefüllt.

Unmittelbar vor Gebrauch werden noch 5 µl 30 % H_2O_2
zusetzt und 150 µl in alle Löcher gefüllt.

Messung : Nach 30 bis 90 Minuten im Dunkeln, je nach Farb-
intensität der Proben und Hintergrundfärbung, wird bei
405 nm Wellenlänge in einem Titertek Multiscan
ELISA-Reader die Extinktion gemessen.

Ziege Lisse Serum und Peroxidase gekoppelter Antikörper
werden in kleinen Aliquoten bei $-80^{\circ}C$ aufbewahrt.

o-Phenylendiamin wird vor Licht geschützt und gekühlt
aufgehoben.

.4. Chromosomenanalyse

Für Hybridome wurde neben der Fähigkeit in selektivem
medium zu wachsen, erfordert, daß sie deutlich mehr als
6 Chromosomen enthalten.

zum Nachweis werden sich teilende Zellen durch das Spin-
elfasergift Colcemid an der Vollendung der Teilung gehin-

dert. Sie verbleiben in der sonst sehr kurzen Metaphase, und Zellen mit in der Äquatorialebene nebeneinander liegenden Chromosomen reichern sich an. Bei entsprechender Präparation können die Chromosomen leicht gezählt werden.

Zu zwei Milliliter einer Zellsuspension werden 10 μ l Colcemid (Gibco, 0435210, 10 mg/ml) hinzugefügt und zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Dann werden die Zellen entnommen, 10 Minuten bei 400 g abzentrifugiert, und der Überstand verworfen. Das Pellet wird resuspendiert, und tropfenweise werden 10 ml einer 75 mM KCl-Lösung zugegeben. Die Zellen bleiben darin 15 Minuten zum Aufquellen und werden dann erneut abzentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen, und unter Schütteln werden 10 ml einer eisgekühlten Mischung 1 : 3 von Methanol und Eisessig zugegeben. Darin werden die Zellen dreimal je 10 Minuten fixiert. Schließlich werden die Zellen im letzten Tropfen resuspendiert.

Objektträger werden durch Einstellen in eine Ethanol - Ether - Mischung von Öl und Fett gereinigt. Nach mindestens zwei Stunden werden sie entnommen, getrocknet und auf einen auf -80°C vorgekühlten Eisblock gelegt, bis sich auf ihnen eine Reifschicht bildet. Auf die vereisten Objektträger wird dann aus mindestens 30 cm Höhe die Zellsuspension aufgetropft. Beim Aufprallen und Auseinanderlaufen der Tropfen platzen die Zellen und Zellkerne und die Chromosomen liegen nebeneinander.

Die Objektträger werden 15 Minuten in einem Trockenschrank bei 80°C getrocknet und 10 Minuten in Giemsa-Lösung gefärbt.

Giemsa : (Merck, 9204) 5 ml Lösung

5 ml Weise'scher Färbepuffer

150 ml Leitungswasser

Danach werden sie mit Leitungswasser abgespült, getrocknet und bei starker Vergrößerung mit einem Ölimmersionsobjektiv unter dem Mikroskop betrachtet. Bei guter Präparation liegen die Chromosomen einer Zelle auf einem hellblauen Fleck, dem Zellkern. Es werden für jede Zelllinie mindestens 10 solche Metaphasefiguren ausgezählt.

Um die produzierten Immunglobuline näher zu charakterisieren, versuchte ich die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese einzusetzen und die Doppeldiffusion.

2.5. SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese)

Diese Methode wurde von Lämmli (32) für die Auftrennung von Proteinen entwickelt. Für die Auftrennung von Immunglobulinen werden Gele mit 10 % Acrylamid verwendet. Moleküle mit Molekulargewichten zwischen 20 000 und 50 000 Dalton wandern darin abhängig von ihrer Größe verschieden schnell. Der Einfluß der Nettoladung wird durch das Tensid SDS fast völlig aufgehoben.

Benötigte Puffer: (Lösungsmittel ist jeweils Aquabidest)

Probenpuffer: 4 ml 10 % SDS
2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
2 ml Glycerin
1 ml Mercaptoethanol
Bromphenolblau bis tiefdunkelblau

Elektrodenpuffer: 16 g Tris und
28,8 g Glycin auf 1000 ml auffüllen und
10 ml 10 % SDS zugeben

Trenngel 10 %ig: 11,38 ml 30 % Acrylamid, 0,8 % Bis,
13,9 ml Aqua bidest
18,75 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
mischen und im Vakuum entlüften,
0,4 ml 10 % SDS
0,02 ml Temed
0,1 ml 10 % Ammoniumperoxiddisulfat

Das Trenngel wird zügig in eine mit Agarosegel abgedichtete Kammer zwischen zwei saubere, trockene Glasplatten mit 1,5 mm Plattenabstand gegossen bis etwa einen Zentimeter unter den Rand, und mit 0,1 % SDS überschichtet. Nach etwa einer Stunde Polymerisationszeit kann das Sammelgel gegossen werden. Davor wird das überschichtete SDS ausgegossen, dreimal mit 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 ausgespült und der gesamte Überstand abgesaugt.

Sammelgel: 1 ml 30 % Acrylamid, 0,8 % Bis
2,5 ml Tris-HCl pH 6,8
6,3 ml Aqua bidest
mischen und im Vakuum entlüften
0,1 ml 10 % SDS
0,005 ml Temed
0,1 ml 10 % Ammoniumperoxiddisulfat

Die Mischung wird auf das Trenngel gegossen, ein Kamm möglichst ohne Luftblasen eingesetzt, und etwa 30 Minuten Zeit gegeben zum Polymerisieren. Dadurch entstehen Geltaschen, in die später die Proben gefüllt werden.

Probenpräparation: Die Proteinproben und eine Mischung von Markern bekannten Molekulargewichtes werden kurz vor dem Lauf des Gels mit Probenpuffer 1:2 verdünnt und drei Minuten im Wasserbad gekocht.

Probenauftrag

Die untere Elektrophoresekammer wird mit Elektrodenpuffer gefüllt, und die Glaskammer nach Freilegen der unteren Gelkante eingesetzt. Luftblasen am Gel müssen entfernt werden, um einen gleichmäßigen Lauf des Gels zu gewährleisten. Dann wird die obere Kammer mit Elektrodenpuffer gefüllt, und der Kamm herausgezogen. Die spezifisch schwereren Proben werden unter den Puffer in die Geltaschen gefüllt. Bei 40 V läuft das Gel am stabilisierten Netzgerät etwa 16 Stunden, bis die als dunkelblaue Linie sichtbare Front kurz vor dem Gelende steht. Größere Proteinmengen im Milligrammbereich lassen sich mit Coomassie-Blau anfärben:

Färbelösung : 4 g Coomassie-Blau R 250

600 ml Mercaptoethanol

140 ml Eisessig

auf 2000 ml auffüllen mit Aqua bidest

Entfärbelösung : 600 ml Mercaptoethanol

140 ml Eisessig

auf 2000 ml auffüllen mit Aqua bidest

Die Glaskammer wird zerlegt und das Sammelgel abgetrennt. Zum Färben wird das Trenngel zwei Stunden in einem geschlossenen Behälter in der Färbelösung geschwenkt. Dann wird die Färbelösung zurückgegossen und das Gel dreimal jeweils für eine Stunde in Entfärbelösung geschwenkt. Die Proben sind nun als dunkelblaue Banden auf hellem Grund zu sehen.

Um radioaktiv markierte Proben nachzuweisen folgt eine weitere Stunde Schwenken in Szintillationssubstanzen En-Hance (New England Nuclear, NEF-966), und eine Stunde Schwenken in Leitungswasser. Das Gel wird dabei milchig-trüb und sehr brüchig.

Trocknen des Gels

Das Trockengerät besteht aus einer flachen Aluminiumwanne mit Vakuumanschluß, die auf 70°C beheizt werden kann. Darin liegt ein Sieb und ein dickes Filterpapier, um das Vakuum zu verteilen. Darauf wird das Filterpapierstück ~~ge-~~legt, auf das das Gel aufgetrocknet werden soll. Es wird naß gemacht und einige Tropfen Glycerin darauf verteilt, um das Gel elastisch zu erhalten und Rissen und Brüchen vorzubeugen. Darauf kommt das Gel. Mit einem Gummituch wird alles luftdicht abgedeckt. Unter Wärmezufuhr und im Vakuum wird das Gel in etwa zwei Stunden auf das Filterpapier aufgepreßt und getrocknet.

Um radioaktiv markierte Banden sichtbar zu machen, wird ein Röntgenfilm belichtet. Das mit Enhance behandelte, getrocknete Gel wird im Dunkeln in einer Kasette direkt auf einen empfindlichen Röntgenfilm (Kodak, XR5) gelegt, die Kasette verschlossen, und zur Belichtung zwei Tage bis drei Wochen in eine -80°C Kühltruhe gelegt. Im Bereich der radioaktiven Banden wird der Film teils direkt durch die beta-Strahlung, teils durch die in der Szintillations-substanz und in der Verstärkerfolie ausgelösten Lichtblitze geschwärzt. Die tiefe Temperatur soll die Hintergrundfärbung vermindern.

Nach der Belichtung kann der Film normal entwickelt werden.

2.6. Doppelimmundiffusion

Diffundieren Antigen und Antikörper von zwei nebeneinander liegenden Punkten in ein dünnes Gel, so bilden sich konzentrische Konzentrationsgradienten aus. In Bereichen etwa gleicher Konzentration von Antigen und Antikörper bilden sich große Komplexe, die bei ausreichender Gesamtkonzentration im Gel ausfallen und als Trübungen in Form von gebogenen Linien und Sicheln sichtbar werden.

Herstellung der Gele: 2 g Agarose
4 g PEG 4000
100 ml PBS

Erhitzen bis sich die Agarose und das PEG völlig gelöst haben, dann je 4 ml in Petrischalen mit 60 mm Durchmesser füllen und auf waagerechter Unterlage erkalten lassen. Fertige Gele können in einer feuchten Kammer einige Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Der PEG Anteil im Agarosegel erleichtert die Diffusion lipidhaltiger Antigene und macht diese Methode wesentlich empfindlicher.

Auftragen der Proben

In gleichmäßigen Abständen von etwa 7 mm werden Löcher ausgestanzt, in die Proben und Seren eingefüllt werden. Dann werden die Gele 24 bis 48 Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Verschiedene anti-human-Immunglobulin-Seren wurden mir vom Labor Professor Rieber zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse wurden zeichnerisch und photographisch festgehalten.

Anti- α = Medac FITC konjugiert, 2172-2

Anti- μ = Medac FITC konjugiert, 2171-2

Anti-Ig G = Hyland FITC konjugiert, 2701 R 007 A1

Anti- κ = Medac 2106,1:6 verdünnt mit PBS

Anti- λ = Medac 2108,1:7,5 verdünnt mit PBS

-Subklassen-spezifische Antikörper:

Centraal laboratorium van de bloedtransfusiendienst,
Amsterdam

Anti- IgG₁ : KH 161-01-P2

Anti- IgG₂ : KH 162-06-P1

Anti- IgG₃ : KH 163-41-P1

Anti- IgG₄ : KH 164-04-P2

3. Ergebnisse

3.1. Maßnahmen, um die Fusionsfrequenz zu erhöhen

Erste human-humane Fusionen mit Wi-L2 und stimulierten B-Lymphozyten nach dem angegebenen Protokoll lieferten nur selten einzelne Hybridome. Als Selektionsmedium diente dabei HAT-Medium mit $1 \times$ Hypoxanthin-Thymidin, wie es in der Maus-Fusion verwandt wird. Wegen dieser geringen Zahl von Ereignissen, war eine systematische Untersuchung einzelner Einflußgrößen in Fusionsexperimenten zunächst nicht möglich.

Deshalb untersuchte ich zunächst den Einfluß von Feeder Layern, konditionierten Medien und den Einfluß der FCS-Charge auf das Wachstum von Wi-L2 und jungen Hybriden unter limiting Dilution Bedingungen. Dieses kommt der Etablierung von Hybridomen sehr nahe, denn auch eine soeben fusionierte Hybridomzelle muß als Einzelzelle beginnend in einem relativ großem Kulturgefäß zu einer Kolonie heranwachsen. Darüber hinaus sind sie noch nicht an die Zellkultur angepaßt, sind dem selektiven Medium ausgesetzt, und es befinden sich noch sehr viele absterbende Zellen im Gefäß, die möglicherweise wachstumshemmende Stoffe freisetzen.

3.1.1. Verwendung von Feeder Layern

3.1.1.1. Konditionierte Medien und Feeder Layern unter limiting Dilution.

Die limiting Dilution Experimente wurden mit den Elternzellen Wi-L2 und Licr-Lon-Hmy 2 und dem human-humanen Hybridom 7D4 und seinen Subklonen durchgeführt.

7D4 und die abgeleiteten Klone wachsen in HAT- und HAZA-Medium, sind annähernd tetraploid und produzieren bis zu 500 ng/ml humanes Immunglobulin. Für den Klon 7D4D7D5

konnte χ und λ Leichtketten nachgewiesen werden.

Mikrotiterplatten mit PEC, GM 730 und FCH-1D5 als Feeder Layer wurden wie beschrieben vorbereitet. Dabei wurde besonders auf gleiche Zelldichte bei GM 730 und FCH-1D5 geachtet.

CM (konditionierte Medien) von GM 730 und FCH-1D5 sind über mehrere Passagen gesammelte, jeweils vor der nächsten Passage abgenommene Kulturüberstände. Sie wurden bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

CM von PEC ist der Überstand von $2,5 \cdot 10^6$ PEC in 25 ml Kulturmedium nach vier Tagen Inkubation in einer Plastikkulturflasche.

Von den CM wurden 0,1 ml je Loch der Mikrotiterplatten vorgegeben. Einfaches Kulturmedium diente in allen Experimenten als Kontrolle.

Es wurde 0,1 ml der Testzellsuspensionen mit 10 Zellen je Milliliter wie beschrieben eingefüllt; für jede Zelllinie 28 Löcher.

Gefüttert wurde mit frischem Kulturmedium bzw den jeweiligen CM;frischem Medium 1:2 verdünnt. Nach drei Wochen wurden die Kolonien enthaltenden Löcher gezählt und die KE berechnet.

Wi-L2 und die Klone des Hybrids verhalten sich gleichsinnig. In allen Experimenten ist das Wachstum mit Feeder Layer und konditioniertem Medium verbessert. Feeder Layer sind den konditionierten Medien überlegen. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse nochmals zusammengefaßt und in der Graphik veranschaulicht.

Zwischen den verschiedenen Feeder Layern ist unter limiting Dilution Bedingungen kein signifikanter Unterschied feststellbar.

Tabelle 1

Wachstumsvergleich unter limiting Dilution
verschiedener Feeder Layer und CM

Experiment 5	Wi-L2	7D4D7	7D4D7D5	KE
RPMI 1640	3	5	3	0,13
CM FCH-1D5	3	6	9	0,21
FCH-1D5	4	3	11	0,27
GM 730	-	9	11	0,36
PEC	10	10	12	0,38
Experiment 6	Wi-L2	7D4D7	7D4D7D5	KE
RPMI 1640	7	5	4	0,19
CM FCH-1D5	15	7	5	0,32
FCH-1D5	14	10	4	0,33
GM 730	15	7	7	0,35
PEC	20	7	11	0,45
Experiment 7	Wi-L2	7D4D7	7D4D7D5	KE
RPMI 1640	0	4	1	0,06
CM FCH-1D5	2	4	1	0,08
FCH-1D5	10	15	10	0,42
GM 730	10	10	18	0,45
PEC	5	6	6	0,20

Löcher mit Wachstum von jeweils 28 angelegten Löchern

KE : bewachsene Löcher / gefüllte Löcher je Platte

Tabelle 1 Fortsetzung

Experiment 9	Wi-L2	7D4G2	7D4D7D5	KE
RPMI 1640	1	3	0	0,05
CM FCH-1D5	1	4	2	0,08
CM GM 730	1	4	3	0,10
PEC	2	7	3	0,14

Experiment 11	Wi-L2	7D4G2	7D4D7D5	KE
RPMI 1640	0	8	14	0,26
CM FCH-1D5	3	11	11	0,30
CM GM 730	8	12	11	0,38
CM PEC	4	8	13	0,30

Löcher mit Wachstum von jeweils 28 angelegten

KE : bewachsene Löcher / gefüllte Löcher je Platte

Tabella 2

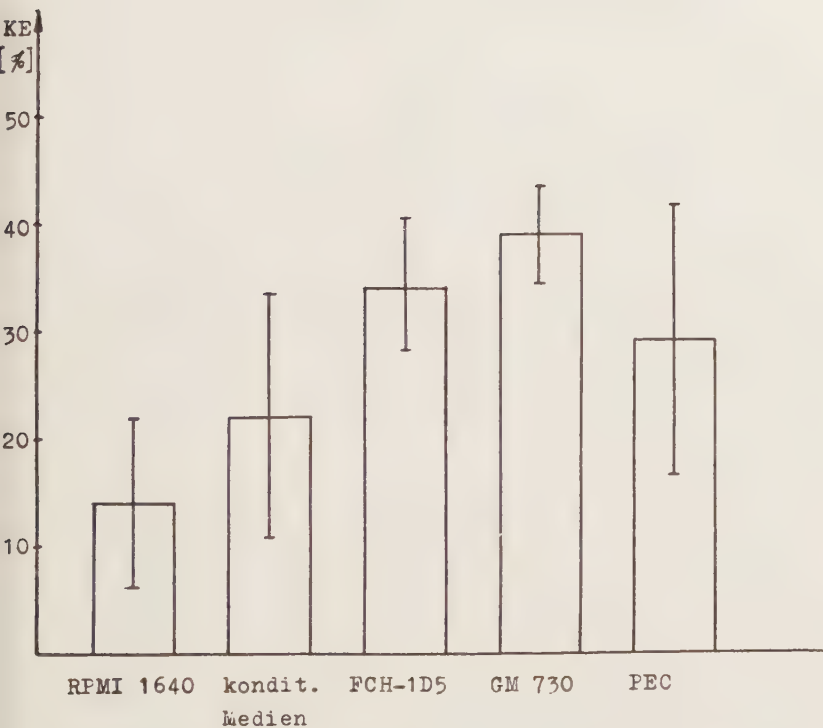
KLoning Efficiency mit verschiedenen Feeder Layern und CM

Experiment	konditionierte Medien				Feeder Layer		
	RPWI 1640	FCH-1D5	GM 730	PEC	FCH-1D5	GM 730	PEC
5	0,13	0,21	-	-	0,27	0,36	0,38
6	0,19	0,32	-	-	0,33	0,35	0,45
7	0,06	0,08	-	-	0,42	0,45	0,20
9	0,05	0,08	0,10	-	-	-	0,14
11	0,26	0,30	0,38	0,30	-	-	-
Mittelwert	0,14		0,22		0,34	0,39	0,29
Standard- Abweichung	0,079		0,113		0,062	0,045	0,127

VE : Zahl der bewachsenen Löcher / Gesamtzahl der gefüllten Löcher je Platte

Graphik I

Kloning Efficiency mit konditionierten Medien
und Feeder Layern



Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung, aus den Experimenten
5, 6, 7, 9 und 11 berechnet

3.1.1.2 Feeder Layer bei Fusionen

Bei späteren Fusionen konnten sowohl mit GM 730 als auch mit PEC als Feeder Zellen Hybridome gezogen werden, jedoch nie ohne Feeder Layer (Tabelle 3). Nähere Angaben zu den einzelnen Fusionen sind in Tabelle 17 enthalten.

Tabelle 3

Fusion mit und ohne Feeder Layer

Fusion Nummer	35	37	38
GM 730	6/48	4/48	1/48
RPMI 1640	0/24	0/48	0/48

Wells mit Hybriden/Gesamtzahl der Wells

In der 29. Fusion wurde nur 14 Tage mit HAZA-Medium selektioniert, dann verdünnt. Deshalb wuchsen in einigen Wells auch nicht-Hybridom Zelllinien. Sie wurden nach dem Karyogramm von den Hybridomen unterschieden.

Tabelle 4

Vergleiche GM 730 und PEC als Feeder Layer

29. Fusion	Zahl der Wells	davon bewachsen	Hybride
GM 730	48	5	3
PEC	48	17	6

3.1.2. Einfluß der FCS-Charge

Eine weitere wichtige Rolle spielt, welche FCS-Charge in Fusionsexperimenten benutzt wird. Verschiedene Autoren haben bereits darauf hingewiesen (23).

Fünf Serumchargen verschiedener Hersteller wurden unter limiting Dilution Bedingungen verglichen und das Ergebnis mit dem Vergleich in Massen-Kulturen und in Maus-Mensch-Xenofusionen verglichen.

Die Seren wurden inaktiviert und Kulturmedien mit 10 % FCS hergestellt. Dazu wurden 1 : 50 Suspensionen von Licr-Lon-HMy 2, Wi-L2 und 7D4D7D5 mit 5000 Zellen je Milliliter gegeben und 0,1 ml-weise auf Mikrotiterplatten verteilt. Es wurde also mit 10 Zellen je Loch kloniert, für jede Zelllinie und jede Charge 32 Löcher.

Am sechsten Tag wurden weitere 0,1 ml Medium zugegeben und am zwölften Tag refüttert. Bereits die Zählungen am Tag neun ergaben die endgültigen Ergebnisse. (Tabelle 5)

Tabelle 5

Vergleich verschiedener FCS-Chargen

Experiment 1

Charge	Licr-Lon	Wi-L2	7D4D7D5	KE
152	0	12	2	0,15
701	0	16	2	0,19
162	0	13	1	0,15
0,18	0	13	4	0,18
134	0	13	0	0,14

Experiment 2

Charge	Licr-Lon	Wi-L2	7D4D7D5	KE
152	0	9	4	0,14
701	1	19	11	0,32
162	0	11	4	0,16
0,18	0	9	5	0,15
134	0	0	2	0,02

Löcher mit Kolonien 9 Tage nach Aussähen von 10 Zellen je Loch, in 32 Löcher.

KE: Zahl der bewachsenen Löcher auf einer Platte/
Gesamtzahl der Löcher

In Experiment 2 zeigt sich eine Charge allen anderen deutlich überlegen.

Von Herrn Dr. H. W. L. Ziepler-Heitbrock wurden die Seren in Massenkulturen verglichen: Licr-lon und 7D4D7D5 wurden auf $1 \cdot 10^5$ Zellen je Milliliter eingestellt, über 5 Passagen in Medien mit den verschiedenen Seren kultiviert und dann erneut gezählt.

Frau Gerhild Wildner fusionierte die Maus-Myelomlinie X 63 Ag 8.563 mit unstimulierten humanen Milzzellen. Kultur und Selektion erfolgten dann in Medien mit den verschiedenen Seren, ohne Feeder Layer.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Durch alle drei Methoden wird die gleiche Charge favorisiert. Die Massenkultur ist dabei nur wenig selektiv. Limiting Dilution zeigt ebenfalls nur in einem der beiden Experimente deutliche Unterschiede. Dieses Ergebnis wird durch die Resultate der xenogenen Fusion klar bestätigt. Schon bei der xenogenen Fusion ist die FCS-Charge für den Erfolg mit ausschlaggebend.

Erst nach Umstellung auf die angeführte Charge 701 und HAZA-Selektionsmedium gelang die gezielte Herstellung humaner Hybride.

Tabelle 6

Vergleich verschiedener FCS- Chargen

FCS-Charge	Massenkultur ^a		limiting Dilution		xenogene Fusion ^b
	Licr-Lon-HMy2 (10 ⁵ /ml) ¹	7D4D7D5 (10 ⁵ /ml) ¹	Wi-L2 KE ²	7D4D7D5 KE ²	bewachsene Löcher/ Gesamtzahl ³
152	-	-	0,28	0,14	-
701	6,7	2,4	0,59	0,34	6 / 162
162	8,5	1,8	0,34	0,14	3 / 153
0,18	5,2	0,5	0,28	0,16	1 / 180
134	6,3	1,9	0,00	0,07	-

¹ : Zellzahl nach 5 Passagen in Massenkultur, beginnend mit 1·10⁵/ml² : bewachsene Löcher / gefüllte Löcher, 9Tage nach Klonieren mit 10 Zellen / Loch³ : Fusion von X 63-Ag 8.653 mit nicht stimulierten humanen Milzzellen,

Zählung nach vier Wochen ,Kultur ohne Feeder Layer.

^a : durchgeführt von Dr. H.W.L. Ziegler-Heitbrock^b : durchgeführt von Fr. G. Wildner

3.1.3. Vergleich von Humanserum und fetalem Kälberserum

Es sind verschiedene Systeme bekannt, in denen homologes Serum vorteilhaft oder unabdingbar ist.

In vergleichenden Fusionen wurde untersucht, ob die Ausbeute an Hybriden durch die Verwendung von Humanserum erhöht wird. Dabei wurde nach der Fusion mit FEG je eine Hälfte der Zellen in HAZA-Selektionsmedium mit 20 % FCS kultiviert und in HAZA- Selektionsmedium mit 15 % HS aus dem unter Methoden beschriebenen Pool. Das ausgewählte Kälberserum ist dabei dem Humanserum überlegen (Tabelle 7).

Tabelle 7

Vergleichende Fusion FCS-HS

Fusion Nummer	30	34
HS	0 / 72 ¹	2 / 48
FCS	14 / 72	7 / 48

¹: Wells mit Hybriden / Gesamtzahl der Wells

3.1.4. Vergleich verschiedener Selektionsmedien.

Wie schon unter Methoden kurz erwähnt, verhindern Amino-
pterin die Purin- und Pyrimidin-Neusynthese, Azaserin die
Purin-Neusynthese mit jeweils verschiedenen Ansatzpunkten.
Wird dem Medium Hypoxanthin und Thymidin, beziehungsweise
nur Hypoxanthin zugesetzt, so können nur Zellen mit dem
Enzym HGPRT die fehlenden Purinnukleotide aus Hypoxanthin
bilden. HGPRT-defiziente Zellen können in selektivem Medi-
um nicht in ausreichender Menge Purinnukleotide bilden und
sterben ab.

Zunächst wurde versucht, die direkt von der Maus-Fusion
übernommene Zusammensetzung des HAT-Mediums für das Fu-
sionsystem mit Wi-L2 zu optimieren. Voruntersuchungen in
diesem Labor haben gezeigt, daß bereits bei Halbierung
des Aminopterinantells im Medium Wi-L2 nicht mehr sicher
an der Proliferation gehindert wird. Deshalb habe ich ver-
sucht, den protektiven Anteil an Hypoxanthin und Thymidin

zu erhöhen. Damit verglichen wurde Selektionsmedium mit HAZA in der von P. A. W. Edwards (15) für Lier-Lon HMy2 angegebenen Konzentration, jedoch ohne Thymidin. Humane Hybridomkulturen und, als Kontrolle, Wi-L2 wurden in gleichen Zelldichten in 24-Well-Platten ausgesät und in den verschiedenen Selektionsmedien kultiviert. Nach einer Woche wurde das Wachstum unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilt. In Tabelle 8 sind repräsentativ zwei Experimente dargestellt. HAZA-Medium zeigt sich darin allen HAT-Medien überlegen.

Tabelle 8

Vergleich von HAT- und HAZA-Medien

	Kultur-		HT 1 x,	HT 2 x,	HT 4 x,
Zelllinien	Medium	HAZA	A 1 x	A 1 x	A 1 x
<u>Exp. 1</u>					
Wi-L2	++	-	ND	ND	-
7D4D7D5	+++	+++	ND	ND	-
18.1A6	++	++	ND	ND	-
18.2C2	+++	+++	ND	ND	-
<u>Exp. 2</u>					
Wi-L2	+++	-	-	-	-
29.2A5	+++	++	-	-	-
29.6A3	+++	+++	-	-	-
30.FCS1B5	+++	-	-	-	-
30.FCS2A3	+++	+++	-	-	-
30.FCS3C2	+++	+++	-	-	-

+++ mehr als 20 Kolonien je Well

++ 5 bis 20 Kolonien je Well

+ 1 bis 5 Kolonien je Well

- kein Wachstum erkennbar

ND nicht untersucht

In zwei Experimenten wurden die selbst zusammengestellten Selektionsmedien mit fertigen HAT-Medien verschiedener Hersteller verglichen. Ihre Zusammensetzung entspricht unserem HT 1 x, A 1 x. Es sind keine signifikanten Unterschiede erkennbar. (Tabelle 9).
Alle Medien enthielten 20 % FCS der gleichen Charge.

Tabelle 9

HAT-Medien verschiedener Hersteller

Zelllinien	Kultur- Medium	HT 1 x, A 1 x	HT 2 x, A 1 x	HAT- Dulb.	HAT- Flow
<u>Exp. 7</u>					
W1-L2	+++	-	-	-	-
7D4D7D5	+++	++	++	+	+
18.1A6F6	+++	+	++	-	+
18.2C2F6	+++	+	+	-	+

Exp. 8

W1-L2	+++	-	-	-	-
7D4D7D5	+	-	-	-	-
18.2C2F6	++	-	+	+	-

- +++ mehr als 20 Kolonien je Well
- ++ 5 bis 20 Kolonien je Well
- + 1 bis 5 Kolonien je Well
- kein Wachstum erkennbar

Die Überlebensfähigkeit des HAZA-Mediums wird noch deutlicher, betrachtet man die Fusionsexperimente:

Aus 8 Fusionen mit vergleichbarem Umfang und Fusionsprotokoll mit HAT-Selektionsmedium konnte kein einziges Hybrid etabliert werden.

In 16 Fusionen mit HAZA-Selektionsmedium konnten aus 12 Fusionen 79 gesicherte Hybride gewonnen werden.

Ein direkter Vergleich wurde in der 34. Fusion durchgeführt. 4 Tage vorstimulierte FBM wurden mit Wi-L2 fusioniert und auf FB-Feeder-Layer kultiviert, (Tabelle 10) mit dem gleichen Ergebnis.

Tabelle 10

Fusion 34: vergleichende Fusion HAT-HAZA

Zahl der Wells	insgesamt	bewachsen	gesicherte Hybridome
HAT	48	0	0
HAZA	48	9	7

3.1.5. Modifikationen des Fusionsprotokolls und ihr Einfluß auf die Fusionsfrequenz

3.1.5.1. Wann soll das Selektionsmedium zugegeben werden?

Zwei Möglichkeiten wurden in unabhängigen Experimenten untersucht.

Tag 0: Nach der Fusion mit PEG wurden die Zellen sofort in Selektionsmedium kultiviert, und erst am siebten Tag nach der Fusion mit selektivem Medium gefüttert.

Tag 1: Nach der Fusion werden die Zellen zunächst in Kulturmedium aufgenommen. Das HAZA-Medium wird erst später zugegeben, in dem dreimal, am ersten, zweiten und dritten Tag nach der Fusion jeweils die Hälfte des Mediums durch Selektionsmedium ersetzt wird. Die nächste Fütterung erfolgt dann am Tag 10.

In Tabelle 11 sind die Daten zusammengefaßt. Es wurden jeweils nur die Teile der Experimente berücksichtigt mit Wi-L2 und vier Tage stimulierte FBM als Fusionspartner, HAZA-Selektionsmedium mit FCS als Medium und FB als Feeder Layer.

Von der Hybridausbeute her erscheinen beide Verfahren gleichwertig zu sein mit 13 % bzw. 10 %. Die Hybridausbeute schwankt sehr stark von Experiment zu Experiment, ohne daß dafür immer Gründe gefunden werden könnten. Um verschiedene Bedingungen zu vergleichen, sollte deshalb ihre parallele Anwendung in einem Experiment versucht werden.

Tabelle 11

Selektionsmedium ab Tag 0 oder Tag 1

<u>Tag 0</u>				Summe
Fusion	27	34	38	
Gesamtzahl der Wells	24	48	48	120
gesicherte Hybridome	8	7	1	16 = 13 %

<u>Tag 1</u>				Summe
Fusion	15	29	30	37
Gesamtzahl der Wells	48	48	72	48
gesicherte Hybridome	1	3	14	4
				21 = 10 %

3.1.5.2. Wie lange sollen die B-Zellen stimuliert werden?

Für besonders fusionsfähig werden B-Zellblasten gehalten, die noch kein Immunglobulin sezernieren (56). Aber es werden auch erfolgreiche Fusionen ohne in vitro Stimulation beschrieben (40). In der 35. Fusion wurden unstimulierte B-Zellen fusioniert, und es konnten sechs gesicherte Hybride etabliert werden.

Deshalb wurden zwei Experimente durchgeführt, in denen unstimulierte B-Zellen und B-Zellen nach vier und sechs Tagen Stimulation mit PWM und TT in gleicher Zahl fusioniert wurden (Tabelle 12). Es wurde auf FB-Feeder-Layern kultiviert und HAZA ab Tag 1 zugegeben.

Ohne Stimulation konnten keine Hybride gewonnen werden, während die längere Stimulation die Hybridomausbeute erhöhte.

Tabelle 12

Dauer der Stimulation und Hybridomausbeute

Fusion	36			37		
	0	4	6	0	4	6
Stimulationstage						
Gesamtzahl der Wells	48	48	48	48	48	48
gesicherte Hybridome	0	0	15	0	4	8

3.1.6. Wie hoch ist die erreichte Fusionsfrequenz?

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß die Zahl der etablierten Hybridome stark von Fusion zu Fusion schwankt. (siehe Tabelle 11). Die Zahl der Experimente reicht noch nicht aus, um exakte Zahlenwerte zu ermitteln. Es kann aber die Größenordnung deutlich werden, die mit dem jetzigen Stand der Methode erreichbar ist.

In Tabelle 13 sind die fünf Telexperimente zusammengestellt mit den größten Hybridomausbeuten.

Dies sind Fusion 27 mit HAZA ab Tag 0, Fusion 35 mit unstimulierten B-Zellen, von Fusion 30 der Ansatz in FCS-Medium, sowie von Fusion 36 und 37 die Teile mit sechs Tage stimulierten B-Zellen. Bei den eingesetzten Zellzahlen sind die für die jeweiligen Telexperimente eingesetzten Mengen angegeben.

Da in einem Well auch zwei und mehr Hybridome sein können, übersteigt die Hybridomzahl die Anzahl der bewachsenen Wells. Die Zahl der Hybridome läßt sich nach der Formel für die Poisson-Verteilung berechnen.

Meistens wird die Zahl der fusionierten B-Zellen angegeben, je erhaltenem Hybridom, entsprechend dem Wert für "stimulierte Zellen je Hybridom" in Tabelle 13.

Tabelle 13

Fusionsfrequenz

Fusion Nummer	27	30	35	36	37	Mittelwert
Gesamtzahl der Wells	24	72	48	48	48	48
Wells mit ges. Hybridomen	8	14	6	15	8	11,6
Gesamtzahl der Hybridome	9,7	15,5	11,2	18,0	9,7	13,2
Dafür eingesetzte Zellen ($\cdot 10^6$)						
aus wievielen ml Blut	100	150	25 ²	180	170	150
eingesetzte PBM	99	258	50 ²	275	275	227
B-Zellen vor Stimulation	15,5	42,5	15 ²	55	42	38,8
fusionierte Zellen	7,5	34	15 ¹	15	15	17,3
eingesetzte Zellen je erhaltenem Hybridom ($\cdot 10^6$)						
aus wievielen ml Blut	10,3	9,6	2,2 ²	10,0	17,5	11,8
eingesetzte PBM	10,2	16,6	4,46 ²	15,3	28,4	17,8
B-Zellen vor Stimulation	1,6	2,74	1,33 ²	3,09	4,3	2,88
fusionierte Zellen	0,77	2,19	1,33 ¹	0,83	1,5	1,3

¹ : Fusion unstimulierter B-Zellen² : nicht im Mittelwert berücksichtigt³ : berechnet nach Poissonverteilung

Im Mittel konnten je $1,3 \cdot 10^6$ stimulierten Zellen der B-Zellfraktion Hybridom etabliert werden. Die Zahl der eingesetzten PBM ist aber noch weit größer, nämlich $17 \cdot 10^6$ je erhaltenem Hybridom. Dabei ist noch nicht berücksichtigt, daß nur ein Teil der Hybridome auch Immunglobulin sezerniert.

Trotz aller genannten Verbesserungen ist die Fusionsfrequenz etwa um eine Zehnerpotenzen kleiner als bei der Maus-Maus-Fusion.

3.2. Eigenschaften der human-humanen Hybridome

In der Regel sind zwei Wochen nach Fusion die ersten Hybridome zu erkennen. Sie bilden Haufen hell leuchtender Zellen. Die Einzelzellen sind größer als Wi-L2, sind granuliert und tragen Pseudopodien. (Bild 1). Sie wachsen etwa so schnell wie Wi-L2 mit Verdopplungszeiten zwischen 24 und 48 Stunden, unter bestimmten Umständen auch kürzer (Tabelle 14). Die Hybridome sind annähernd tetraploid mit 70 bis 90 Chromosomen (Bild 2). Von 85 chromosomenanalytisch gesicherten Hybridomen produzieren in dicht bewachsenen Kulturen 34 Hybridome (40 %) über 20 ng/ml Immunglobulin (Wi-L2 weniger als 10 ng/ml). Bei 12 Hybridomen (14 %) konnten 100 bis 500 ng/ml gemessen werden (Tabelle 15). Die Ig-Produktion einer Reihe von Hybridome und davon abgeleiteten Klonen wurde über mehrere Monate beobachtet (Tabelle 16). Bei 20 beobachteten Kulturen über zwei bis 6 Monate ohne zwischendurch zu klonieren, wurde bei zwei Subklonen (kloniert mit 5 Zellen je Well) und einem Klon (kloniert mit 0,5 Zellen je Well) des Hybridoms 7D4 der Verlust der Ig-Produktion beobachtet.

Bild 1 : Seite 48

Bild 2 : Seite 93

Tabelle 14

Wachstumsgeschwindigkeit

Zelllinie	Wi-L2	
Anfangszellzahl c_0	$40 \cdot 10^4$ in 8ml	$40 \cdot 10^4$ in 8ml
nach 48h	+ 15ml Medium	+ 10ml Medium
nach 72h		+ 10ml Medium
Zellzahl c nach 96h	$552 \cdot 10^4$	
Zellzahl c nach 144h		$2800 \cdot 10^4$
c / c_0	13,8	70
T_2	25,4h	23,5h

Zelllinie	7D4D7D5	30.3C2	36.6.7C1
Anfangszelldichte c_0	$5 \cdot 10^4$ /ml	$5 \cdot 10^4$ /ml	$5 \cdot 10^4$ /ml
Dichte c nach 72h	$24 \cdot 10^4$ /ml	$25 \cdot 10^4$ /ml	$20 \cdot 10^4$ /ml
c / c_0	4,8	5	4
T_2	31,8h	31h	36h

$$T_2 = \frac{\ln 2 \cdot t}{\ln (c / c_0)}$$

T_2 : Verdoppelungszeit

t : Beobachtungszeit

c : Zellzahl nach der Zeit t

c_0 : Ausgangszellzahl

Tabelle 15

Bisher etablierte Hybridome

Bezeichnung	Chromosomen	Ig-Sekretion (ng/ml)	eingefroren	kloniert in N ₂
3B3	74,3	<10	+	-
7D4	85,4	500	+	+
8.3A2	81,7	50	+	-
15.1B1	85,4	200	+	+
16.3C1	70,8	150	+	+
18.1A6	75,2	150	+	+
18.2C2	79,4	30	+	+
19.3B5	74,0	<10	-	-
26.50B2	89,7	100	+	-
27A2	84,7	<10	-	-
27A5	77,6	<10	-	-
27B2	75,0	<10	-	-
27B3	67,0	<10	-	-
27C3	76,5	50	+	-
27D1	85,3	<10	-	-
27D4	74,5	250	+	-
27D5	82,9	<10	-	-
27D6	78,5	100	+	-
28.0D6	79,1	20	+	-
28.2A6	74,3	100	+	-
28.2D5	86,2	20	+	-
29.2A4	77,7	<10	-	-
29.2A5	68,7	100	+	-
29.2A6	80,5	15	+	-
29.2B5	89,3	60	+	-
29.2D2	74,5	70	-	-
29.2D3	54,3	30	+	-
29.5B1	65,2	<10	+	-
29.6A3	76,2	70	+	-
29.6D4	62,8	30	-	-

Tabelle 15 Fortsetzung

Bezeichnung Chromosomen 1 σ -Sekretion eingefroren kloniert
(n σ /ml) in N₂

30 FCS 1A3	91,5	20	+	-
30 FCS 1B4	87,7	50	+	-
30 FCS 1B5	89,7	70	+	-
30 FCS 1C5	90,2	15	+	-
30 FCS 1D1	73,3	15	+	-
30 FCS 1D6	90,7	10	+	-
30 FCS 2A3	89,5	60	+	-
30 FCS 2A5	79,3	15	+	-
30 FCS 2B1	77,7	<10	+	-
30 FCS 2B4	76,5	20	+	-
30 FCS 2C4	81,7	<10	+	-
30 FCS 3A3	77,7	50	+	-
30 FCS 3C2	75,6	150	+	+
30 FCS 3C6	74,0	25	+	-
34.1A6	91,8	15	+	-
34.2D4	90,0	<10	-	-
34.5A2	76,2	<10	+	-
34.5B3	79,0	<10	-	-
34.5C1	73,3	<10	+	-
34.5D6	90,0	<10	+	-
34.5D1	88,0	<10	-	-
34.6A2	82,7	15	+	-
34.6C5	85,5	100	-	-
35.01B1	71,7	30	+	-
35.01C3	84,5	<10	+	-
35.02A5	86,7	<10	+	-
35.02C3	90,3	<10	+	-
35.02D4	64,0	<10	-	-
36.6A5	80,3	<10	+	-
36.6B2	78,7	20	+	-
36.6B6	73,7	<10	+	-

Tabelle 15 Fortsetzung

Bezeichnung	Chromosomen	I σ -Sekretion eingefroren kloniert (n σ /ml)	in N ₂	
36.6C1	70,0	<10	+	-
36.6C2	64,2	<10	+	-
36.6D1	89,0	80	+	-
36.6D2	75,0	<10	-	-
36.6D5	73,0	<10	+	-
36.6D6	72,6	<10	+	-
36.7A5	88,2	<15	+	-
36.7B6	68,7	<10	+	-
36.7C1	68,5	300	+	-
36.7C5	70,5	15	+	-
36.7C6	81,8	<10	+	-
36.7D5	88,2	<10	-	-
37.4.3A3	78,0	<10	+	-
37.4.3A6	77,2	<10	+	-
37.4.3B5	89,0	<10	+	-
37.4.3B6	82,7	<10	+	-
37.6.1B1	86,3	15	+	-
37.6.1C1	83,7	<10	+	-
37.6.1D2	76,3	15	+	-
37.6.1D4	83,5	<10	+	-
37.6.1D5	81,0	100	+	-
37.6.2A5	80,3	30	+	-
37.6.2B1	85,0	50	+	-
37.6.2C3	83,5	<10	+	-
38.1D5	78,0	<10	+	-

Bild 1



Wi-L2 729 HF₂ im Phasenkontrastmikroskop



Hybridom im Phasenkontrastmikroskop

Tabelle 16

Stabilität der Hybridome

				Kultur ohne
				Unterbrechung
				25 Tage
10.8.81	28.8.81	4.9.81		
7 Fusion	7D4 ist Ig(+)	7D4 wird subkloniert und ist weiter	Ig(+)	
4.9.81				
7D4 Subklonieren	7D4G2	80ng/ml	eingefroren am 1.12.81, 200ng/ml	3 Monate
	7D4D9	170ng/ml	" " 1.12.81, 50ng/ml	3 Monate
	7D4F9	570ng/ml	" " 14.12.81, 100ng/ml	3 Monate
	7D4D7	230ng/ml	am 17.1.82, 80ng/ml, am 26.2.82, Ig(-)	5 Monate
10.9.81	10.81		1.-14.12.81	
7D4D7 kloniert	2 Klone von 7D4D7 mit 20-80ng/ml		Einfrieren der Klone	
			5 Klone 20-80ng/ml	2 Monate
			1 Klon Ig(-)	2 Monate
			Klon 7D4D7D5 am 17.1.81, 50ng/ml, am 26.2.82, Ig(-)	4 Monate
26.2.82	30.3.82	21.4.82	25.4.82	
7D4G2 aufgetaut	80ng/ml	80ng/ml	eingefroren	2 Monate
26.2.82	30.3.82	21.4.82	30.4.82	
7D4D7D5 aufgetaut	100ng/ml	100ng/ml	200ng/ml	4 Monate
8.7.82	13.8.82	14.10.82	14.12.82	
7D4D7D5 aufgetaut	250ng/ml	500ng/ml	60ng/ml	eingefroren, 50ng/ml
				6 Monate

Tabelle 15 Fortsetzung Stabilität der Hybridome

					Kultur ohne	
					Unterbrechung	
14.4.82	7.5.82	9.6.82		28.6.82	eingefroren, 70ng/ml	2 Monate
15. Fusion	15.1B1 Ig(+)	15ng/ml				
5.7.82	20.7.82		13.8.82	1.9.82	24.9.82	
15.1B1 klonieren	15.1B1C5	80ng/ml	200ng/ml	200ng/ml	300ng/ml	2 Monate
1.10.82	28.10.82	22.11.82	6.12.82		28.1.83	
15.1B1C5 aufgetaut	30ng/ml	25ng/ml	100ng/ml	eingefroren, 25ng/ml		4 Monate
20.8.82	4.9.82	15.9.82		28.10.82		
30. Fusion	30.3C2, 250ng/ml	eingefroren, 100ng/ml		300ng/ml		2 Monate
3.12.82	6.12.82	28.1.83				
30.3C2 aufgetaut	100ng/ml	eingefroren, 25ng/ml				2 Monate
14.10.82	10.11.82	22.11.82	30.11.82		6.12.82	
36. Fusion	36.6.7C1 entdeckt	80ng/ml	70ng/ml	eingefroren		1,5 Monate
3.12.82	16.12.82	23.1.83	28.1.83			
36.6.7C1 aufgetaut	300ng/ml	200ng/ml	120ng/ml			2 Monate

3.3 Charakterisierung des produzierten Immunglobulins

3.3.1 SDS-PAGE

Ziel der Untersuchung ist, die Ig-Klasse zu bestimmen, und Hinweise für die Monoklonalität des sezernierten Immunglobulins zu erhalten.

Monoklonales Immunglobulin sollte eine scharfe Bande liefern im Bereich von 22000 Dalton für die leichte Kette und eine scharfe Bande für die schwere Kette, bei 50000 Dalton für eine γ -Kette, bei 70000 für eine μ -Kette.

Eine dritte und vierte Bande wären zu deuten als getrennt laufende, von Wi-L2 und der im Hybridom verschmolzenen B-Zelle determinierte Ig-Ketten.

Während dieser Nachweis bei Maus-Maus-Hybridomen ohne Schwierigkeiten gelingt, ergeben sich bei den zur Verfügung stehenden humanen Hybridomen erhebliche Probleme.

Da die Ig-Mengen in Kulturüberständen viel zu klein sind, um nach der Auftrennung in der Färbung mit Coomassie-Blau sichtbar zu sein, wurde das Ig durch internal labeling radioaktiv markiert, und Autoradiogramme angefertigt.

Aus Selektamin wurde ein lysinfreies, serumfreies Medium hergestellt. Darin wurden die Testzellen 30 Minuten vorinkubiert, um freies Lysin zu entfernen. Dann in neues Medium aufgenommen, wurde 50 μ Ci tritiummarkiertes Lysin zugegeben und 6 h inkubiert.

Nach dieser Zeit waren fast alle Zellen abgestorben und der Lysin-Einbau deshalb ungenügend.

Durch Zusatz von 10 % inaktiviertem FCS, aus dem durch

Dialyse freie Aminosäuren entfernt worden waren, konnte die Überlebensrate verbessert werden, auf wenigstens 50 % lebende Zellen nach 24 h Inkubation.

Ein weiterer Versuch, mit leucinfreiem MEM, 10 % inaktiviertem, dialysiertem FCS und ^3H -Leucin ergab für Überstände wie Zelllysate von Wi-L2 und 7D4D7D5 eine große Zahl nicht zuordenbarer Banden im Autoradiogramm, ohne verwertbaren Unterschied zwischen Hybridom und Elternzelle. Deshalb wurde versucht, durch Immunpräzipitation das Ig anzureichern. Dies wurde zunächst mit einem Kaninchen-anti-human-Ig versucht, das über Protein A an Sepharose gebunden wurde. Zur Vorabsorbition diente Protein A-Sepharose mit unspezifischem Kaninchen-Ig. Unspezifische Aktivität konnte damit gut entfernt werden. Die verbleibende Aktivität in markiertem Ig lieferte selbst bei sehr langer Exposition nur zarte Banden. Deshalb wurde der energiereichere β -Strahler ^{35}S in ^{35}S -Methionin mit höherer spezifischer Aktivität eingesetzt, in Verbindung mit methioninfreiem Selektamin. Um die Frage zu klären, ob Hybridome überhaupt in labeling-Medium Ig produzieren, wurden 7 Ig produzierende Hybridome auf ihre Fähigkeit, in Selektamin Ig zu sezernieren untersucht und das relativ beste Hybridom 30.3.C2 für internal labeling mitbenutzt (siehe Tab. 17). Zur Immunpräzipitation wurde im Vergleich ein direkt an Sepharose gebundener Ziege-anti-human-Antikörper eingesetzt, mit Vorabsorbition der Proben und der Antikörper-Sepharose (Bild 3 Seite 94).

Trotz aller genannten Maßnahmen war es mir nicht möglich, bei technisch einwandfreier Auftrennung, Ig eindeutig nachzuweisen.

Tabelle 17

Ig-Produktion in Selektamin in ng/ml

in Kultur-		Stunden in Selektamin		
Medium		4	24	48
Wi-L2	10	0 ¹	0	0
7D4D7D5	200	ND	25	25
15.1D105	200	ND	18	22
29.2A5	100	5	5	10
29.6A3	70	0	0	0
30.1B5	70	0	0	0
30.2A3	60	3	15	30
30.3C2	150	25	60	100

0¹: unter den Background-werten im ELISA

ND: nicht untersucht

3.3.2 Doppelimmundiffusion

Einige hundert Milliliter Überstand dicht bewachsener Hybridomkulturen wurden gesammelt und über eine kleine 2 ml Sepharose 4B Säule mit einem direkt daran gekoppelten Ziege-anti-human-Ig-Antikörper hoher Affinität absorbiert. Die Säule wurde von Prof. Kieber zur Verfügung gestellt. Das in der Säule verbliebene Medium wurde mit Immunglobulin mit 10 ml 4 N Harnstoff in 0,02 M Acetatpuffer pH 4 gelöst. Das Eluat wurde zur Schonung des Immunglobulins sofort mit 50 ml PBS verdünnt. Die erhaltene Lösung wurde durch Vakuumdialyse gegen Wasser in einem Dialyseschlauch mit einer Durchlässigkeit mit 10000-15000 Dalton eingestellt. Die erreichte Ig-Konzentration wurde mit dem ELISA an verdünnten Proben bestimmt.

15.1.B1C5

Das Immunglobulin wurde auf 9 $\mu\sigma$ /ml angereichert. Die Seren wurden in der in Bild 5 angegebenen Anordnung eingefüllt. Von 15.1B1C5 wurden je 30 μ l, von den Seren je 10 μ l bis 15 μ l in die Löcher gefüllt. Bei 15.1B1C5 und anti- α , anti- μ , und anti-IgG wurde jeweils die selbe Menge nachgefüllt. Nach zwei Tagen zeigen sich deutliche Präzipitate mit anti- κ und anti-IgG.

Bei der γ -Subklassenbestimmung wurden insgesamt 60 μ l des 15.1B1C5 Konzentrats und je 10 μ l der Antiseren eingesetzt. Es ist eine Reaktion mit anti- γ_2 zu erkennen (Bild 6).

7D4D7D5

Es wurde eine Anreicherung auf 30 $\mu\sigma$ /ml erreicht. Davon wurden 30 μ l eingesetzt, von den Antiseren je 10 μ l. In Bild 7 ist eine eindeutige Reaktion mit anti- κ und anti- λ zu sehen, sowie mit anti- α und anti-IgG.

Mit der Fähigkeit in Selektionsmedium zu wachsen, dem annähernd tetraploiden Chromosomensatz und den für 7D4D7D5 nachgewiesenen zwei schweren und leichten Immunglobulinketten, ist die Hybridnatur der etablierten Zelllinien zweifelsfrei gesichert.

Bild 5 : Seite 95

Bild 6 : Seite 95

Kurzprotokolle der erfolgreich durchgeführten Fusionen

15. Fusion Spender D. 400 ml Blut FBM: $570 \cdot 10^6$
T-Separation B-Anteil: 31 % B-Frakt.: $166 \cdot 10^6$
Ausbeute: 93 % T-Frakt.: $370 \cdot 10^6$
T-Frakt. bestrahlt, Stimulation 4 Tage mit FWM
Zellen: $26 \cdot 10^6$ Blasten: 40 % je Well : $3,3 \cdot 10^5$
Wi-L2 : $10 \cdot 10^6$ Fusion 2,6:1 je Well : $1,4 \cdot 10^5$
auf 72 Wells, FB Feeder Layer, in Kulturmedium
Füttern mit HAZA Medium Tag 1, 2, 3, 7, 10,
HAZA ausverdünnen Tag 14, 15, 16, 20, 24, usw.
sichtbare Kolonien ab Tag 30, 1 Hybridom, 2 nicht-Hybridome

18. Fusion CLL-Patient H. mit $200 \cdot 10^6$ Leukozyten/ml Blut
einfrefr. Zellen auftauen, keine Separation, keine Stimul.
Zellen: $20 \cdot 10^6$ je Well : $4,2 \cdot 10^5$
Wi-L2 : $14 \cdot 10^6$ Fusion 5:1 je Well : $0,8 \cdot 10^5$
PEG 3 min einwirken lassen, PEG nicht abzentrifugieren,
auf 48 Wells, PEC Feeder Layer, in Kulturmedium
Tag 0: 2x füttern mit kulturmedium
Füttern mit HAZA medium Tag 1, 2, 3, 7, 10, usw.
HAZA ausverdünnen ab Tag 24
sichtbare Kolonien ab Tag 28, 2 Hybridome, 3 nicht-Hybridome

19. Fusion Spender R.R. 150 ml Blut FBM: $150 \cdot 10^6$
keine Separation, Stimulation 5 Tage mit FWM
Zellen: $40 \cdot 10^6$ Blasten: 50 %
Wi-L2 : $4 \cdot 10^6$ 30 % tote, nach 2x serumfrei waschen bei 4°C
dritteln, aufnehmen in je 2 ml DEPC verdünnt in kaltem PBS
1,5 : 10^5 1,0 : 10^5 0,66 : 10^5
30 min auf Eis, 2x aufschütteln, 1x waschen in RPMI 1640
Zellen: $13 \cdot 10^6$ Blasten 50 % je Well : $5 \cdot 10^5$
Wi-L2 : $1,3 \cdot 10^6$ 3 Fusionen 10:1 je Well : $0,5 \cdot 10^5$
je 24 Wells, FB Feeder Layer, in kulturmedium,
wöchentlich füttern, sichtbare Kolonien ab Tag 35 bei der
niedrigsten DEPC Konzentration, 1 Hybridom, 1 nicht-Hybridom

26. Fusion aufgetaute Milzzellen $150 \cdot 10^6$, unter 5 % tote
keine Separation, Stimulation 5 Tage PWM
Zellen: $80 \cdot 10^6$ je Well: $8,3 \cdot 10^5$
Wi-L2 : $40 \cdot 10^6$ 4 Fusionen 4:1 je Well: $2,1 \cdot 10^5$
je 10^6 Wi-L2 vorbehandeln mit DEPC wie in der 19. Fusion,
DEPC verdünnt in FBS 0,5 : 10^5 0,7 : 10^5 1,2 : 10^5
und 10^6 unbehandelte Wi-L2,
je 24 Wells, FEC Feeder Layer, in Kulturmedium
unbehandelte Wi-L2: füttern mit HAZA Tag 1, 2, 3,
Tag 6: alle Wells überwachsen, frisches HAZA Tag 6, 8, 15,
DEPC behandelte Wi-L2 wöchentlich füttern mit Kulturmedium
bei der niedrigsten DEPC Konzentration 1 Hybridom

27. Fusion Spender H.H. 400 ml Blut FBK: $396 \cdot 10^6$
T-Separation B-Anteil: 30 % B-Frakt.: $63 \cdot 10^6$
Ausbeute: 50 % T-Frakt.: $130 \cdot 10^6$
T-Frakt. bestrahlt, Stimulation 4 Tage PWM
Zellen: $30 \cdot 10^6$ Blasten: 41 % je Well : $3,1 \cdot 10^5$
Wi-L2 : $10 \cdot 10^6$ Fusion 3:1 je Well : $1 \cdot 10^5$
auf 96 Wells, FB Feeder Layer, primär in HAZA Medium
72 Wells verloren, wöchentlich füttern
sichtbare Kolonien ab Tag 14, 8 Hybridome, 6 nicht-Hybridom

28. Fusion aufgetaute Milzzellen $170 \cdot 10^6$, 3 % tote
keine Separation, Stimulation 4 Tage PWM
Zellen: $53 \cdot 10^6$ Blasten: 44 % je Well: $5,6 \cdot 10^5$
Wi-L2 : $18,6 \cdot 10^6$ Fusion 2,8:1 je Well: $2,0 \cdot 10^5$
auf 96 Wells, FB Feeder Layer, 72 Wells mit Kulturmedium
24 Wells primär Kultur in HAZA, füttern Tag 2, 4, 10, usw.
24 Wells füttern mit HAZA Tag 1, 2, 3, 10, 17, usw.
24 Wells füttern mit HAZA Tag 2, 3, 4, 10, 17, usw.
24 Wells füttern mit HAZA Tag 3, 4, 5, 10, 17, usw.
sichtbare Kolonien ab Tag 29

	HAZA ab Tag			
	0	1	2	3
Wells mit Wachstum	2	0	6	0
Wells mit Hybridomen	1	0	2	0

29. Fusion Spender D. 400 ml Blut PBM: 420.10⁶
 T-Separation B-Anteil: 36 % B-Frakt.: 125.10⁶
 Ausbeute: 100 % T-Frakt.: 310.10⁶
 T-Frakt. bestrahlt, Stimulation 4 Tage PWM
 Zellen: 24.10⁶ Blasten: 54 % je Well : 2,5.10⁵
 Wi-L2 : 9,4.10⁶ Fusion 2,6:1 je Well : 1.10⁵
 auf 48 Wells, FB Feeder Layer, in Kulturmedium
 auf 48 Wells, PEC Feeder Layer, in Kulturmedium
 Füttern mit HAZA Tag 1, 2, 3, 10, 17, 24
 HAZA ausverdünnen Tag 25, 26, 27, 34, usw. je 24 Wells
 mit Kulturmedium und H-Medium

	FB	PEC	
Ø	2 / 1	13 / 6	Wells mit Wachstum /
H	3 / 2	4 / 0	Wells mit Hybridomen

30. Fusion Spender F.H. 300 ml Blut PBM: 517.10⁶
 T-Separation B-Anteil: 20 % B-Frakt.: 85.10⁶
 Ausbeute: 80 % T-Frakt.: 310.10⁶
 T-Frakt. bestrahlt, Stimulation 4 Tage PWM
 Zellen: 68.10⁶ Blasten: 20 % je Well : 4,7.10⁵
 Wi-L2 : 14.10⁶ Fusion 4,8:1 je Well : 1.10⁵
 auf 144 Wells, FB Feeder Layer, zur Hälfte in Kulturmedium
 mit 20 % FCS und 15 % HS
 Füttern mit HAZA Medien Tag 1, 2, 3, 7, 10, 14, 18, 22, usw.
 sichtbare Kolonien ab Tag 28, 14 Hybridome, 10 nicht-Hybridome
 alle in FCS Medium, kein Wachstum in HS Medium

34. Fusion Spender E.M. 400 ml Blut IBL: $336 \cdot 10^6$

T-Separation B-Anteil: 33 % B-Frakt.: $87 \cdot 10^6$

Ausbeute: 77 % T-Frakt.: $172 \cdot 10^6$

T-Frakt. bestrahlt, Stimulation 4 Tage mit PWM und TT

Zellen: $49 \cdot 10^6$ Blasten: 26 % je Well : $4,3 \cdot 10^5$

Wi-L2 : $13 \cdot 10^6$ Fusion 3,8:1 je Well : $0,9 \cdot 10^5$

48 Wells primär in HAZA Medium 15 % HS

48 Wells primär in HAZA Medium 20 % FCS

48 Wells primär in HAT Medium 20 % FCS

FB Feeder Layer
wöchentlich fütt.

7 Hybridome in HAZA Medium mit 20 % FCS

35. Fusion Spender F.S. 400 ml Blut FBL: $800 \cdot 10^6$

T-Separation B-Anteil: 32 % B-Frakt.: $244 \cdot 10^6$

Ausbeute: 70 % T-Frakt.: $314 \cdot 10^6$

Zellen: $15 \cdot 10^6$ ohne Stimulation je Well : $3,1 \cdot 10^5$

Wi-L2 : $5 \cdot 10^6$ Fusion 3:1 je Well : $1 \cdot 10^5$

auf 48 Wells, FB Feeder Layer, primär in HAZA Medium

$100 \cdot 10^6$ Zellen der B-Frakt. Stimulation 6 Tage mit PWM, TT

Zellen: $39 \cdot 10^6$ Blasten: 39 % je Well : $5,4 \cdot 10^5$

Wi-L2 : $7 \cdot 10^6$ Fusion 5,6:1 je Well : $9,7 \cdot 10^4$

auf 48 Wells, FB Feeder Layer, 24 Wells ohne Feeder Layer,

primär in HAZA Medium, alle wöchentlich füttern

sichtbare Kolonien ab Tag 35

6 Hybridome, Ø nicht-Hybridome, alle auf FB Feeder Layer

36. Fusion Spender H.H. 400 ml Blut PBM: $510 \cdot 10^6$
T-Separation B-Anteil: 37 % B-Frakt.: $126 \cdot 10^6$
Ausbeute: 65 % T-Frakt.: $192 \cdot 10^6$
Zellen: $15 \cdot 10^6$ ohne Stimulation je Well : $3,1 \cdot 10^5$
Wi-L2 : $5 \cdot 10^6$ Fusion 3:1 je Well : $1 \cdot 10^5$
auf 48 Wells, FB Feeder Layer, in Kulturmedium
T-Frakt. bestrahlt, eine Hälfte Stim. 4 Tage mit PWM, TT
Zellen: $18 \cdot 10^6$ Blasten: 55 % je Well : $2,7 \cdot 10^5$
Wi-L2 : $7,6 \cdot 10^6$ Fusion 2,4:1 je Well : $1 \cdot 10^5$
auf 48 Wells, FB Feeder Layer, in Kulturmedium
auf 24 Wells, FB Feeder Layer, primär in HAZA Medium
andere Hälfte 6 Tage Stimulation mit PWM und TT
Zellen: $15 \cdot 10^6$ Blasten: 40 % je Well : $3,1 \cdot 10^5$
Wi-L2 : $5 \cdot 10^6$ Fusion 3:1 je Well : $1 \cdot 10^5$
auf 48 Wells, FB Feeder Layer, in Kulturmedium
jeweils füttern mit HAZA Medium Tag 1, 2, 3, 10, 17, usw.
primäre Kultur in HAZA wöchentlich füttern
nach 6 Tage Stimulation 15 Hybridome, Ø nicht-Hybridome
0 und 4 Tage Stimulation: kein Wachstum

37. Fusion Spender S.K. 400 ml Blut PBM: $665 \cdot 10^6$
T-Separation B-Anteil: 25 % B-Frakt.: $100 \cdot 10^6$
Ausbeute: 60 % T-Frakt.: $300 \cdot 10^6$
T-Frakt. Bestrahlt, 10, 4 und 6 Tage Stimulation
mit PWM und TT jeweils:
Zellen: $15 \cdot 10^6$ (bzw. B-Frakt.) je Well : $3,1 \cdot 10^5$
Wi-L2 : $5 \cdot 10^6$ Fusion 3:1 je Well : $1 \cdot 10^5$
je auf 48 Wells, FB Feeder Layer, in Kulturmedium
Füttern mit HAZA Medium Tag 1, 2, 3, 10, 17, usw.

	Stimulation Tage		
	0	4	6
Wells mit Hybridomen	0	4	8

38. Fusion Spender D. 350 ml Blut FBM: $384 \cdot 10^6$
T-Separation B-Anteil: 37 % T-Frakt.: $114 \cdot 10^6$
Ausbeute: 79 % T-Frakt.: $191 \cdot 10^6$
T-Frakt. bestrahlt, Stimulation 4 Tage mit FWM und TT
Zellen: $38 \cdot 10^6$ Elasten 28 % je Well : $2,6 \cdot 10^5$
Wi-L2 : $15 \cdot 10^6$ Fusion 2,3:1 je Well : $1 \cdot 10^5$
je 48 Wells mit FB, PEC und ohne Feeder Layer,
primär in HAZA Medium, wöchentlich füttern
PEC kontaminiert
sichtbare Kolonien ab Tag 22
auf FB Feeder Layer 2 Hybridome, keine nicht-Hybridome
Ohne Feeder Layer kein Wachstum

4. Diskussion

4.1. Verfahren zur Herstellung humaner monoklonaler Antikörper

Die von G. Köhler und C. Milstein (26) entwickelte Zellfusion ist inzwischen die Methode der Wahl zur Herstellung von Maus-monoklonalen Antikörpern. Dabei wird eine HGPRT-defiziente Myelomzelle mit der Eigenschaft, sich in vitro unbegrenzt zu teilen, mit B-Lymphozyten aus Mäuse-Milz zur Verschmelzung gebracht. Dazu wurden früher die Zellen mit inaktivierten Sendai Virus Partikeln inkubiert, während heute die Zellen mit PEG behandelt werden, da die Fusionsrate damit bis 100fach höher ist. (19)

Anschließend werden die Zellen unter geeigneten Bedingungen in selektivem Medium kultiviert. Das übliche HAT Selektionsmedium enthält Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin in den von J. W. Littlefield (37) angegebenen Konzentrationen, aber es kann auch HAZA Medium mit Hypoxanthin und Azaserin für die Maus-fusion verwandt werden (7).

Nicht fusionierte B-Lymphozyten sind nur begrenzt teilungsfähig, und Myelomzellen können aufgrund ihres Enzymdefektes in Selektionsmedium nicht wachsen. Hybridome werden dagegen kaum in ihrem Wachstum behindert.

Ein Teil der Hybridome sezerniert das vom B-Lymphozyten determinierte Immunglobulin. Hybridome, die relevante Antikörper produzieren, können gezielt vermehrt werden, und das Immunglobulin kann aus den Kulturüberständen gewonnen oder, nach Implantation des Hybridoms in die Bauchhöhle einer Maus, aus Peritonealexsudat isoliert werden.

Die Entwicklung der humanen Fusion nach dem Muster der Maus-Fusion bereitet einige Probleme, so daß zunächst

auch an andere Verfahren zur Gewinnung humaner monoklonaler Antikörper zu denken ist.

4.1.1. Alternativen zur human-humanen Zellfusion

Transformation mit EBV

Nach in vitro Infektion von B-Zellen mit Epstein-Barr Virus können Zellen unbegrenzt teilungsfähig werden. Durch die Transformation entstehen LCL (lymphoclastoide Zelllinien), von denen ein Teil monoklonales Immunglobulin sezerniert (16). Die Transformationsrate ist mit einer transformierten Zelle je 10^3 - 10^4 B-Zellen hoch im Vergleich zu den Fusionsraten bei human-humanen Fusionen. (23, 1).

Als zwei Hauptprobleme der EBV-Technik zeigen sich jedoch bei verschiedenen Untersuchern, daß LCL meist nur recht wenig Immunglobulin sezernieren, um 20 ng/ml, und dies oft auch nur über wenige Wochen (4, 22, 29). Die Ig-Sekretion kann auch durch, bei LCL's oft schwieriges, Klonieren nicht immer gesichert werden. Trotzdem ist zum Beispiel M. Steinitz u. a. (53, 54) gelungen, mit hochgradiger spezifischer Anreicherung der B-Zellen und primärem Klonieren gleich bei der Transformation eine stabile, sezernierende Zelllinie und einen monoklonalen Antikörper gegen aggregiertes humanes IgG zu erhalten.

Außer EBV sind noch andere transformierende Viren bekannt, zum Beispiel Simian Virus 40. Für die Immortalisation von B-Lymphozyten spielen sie zur Zeit keine Rolle. Vielleicht gewinnen sie aber noch Bedeutung in Verbindung mit neuen genetischen Techniken.

Mensch-Maus-Xenofusion

Werden menschlich B-Lymphozyten mit Maus-Myelomzellen

fusioniert, so sind Fusionsfrequenzen ähnlich wie bei der Maus-Maus-Fusion zu erreichen und beachtlich Sekretionsraten im Bereich von $\mu\text{g/ml}$. Gleichzeitig mit humanem Immunglobulin sezerniertes Maus-Ig und Hybridantikörper aus schweren und leichten Ketten beider Spezies können stören. Sie entstehen jedoch nicht, wenn zur Fusion eine non-secretor Maus-Myelomlinie benutzt wird (33).

Ein gravierender Nachteil nach Ansicht vieler Autoren ist jedoch die Instabilität der Mensch-Maus-Hybridome. Auch noch nach vielen Passagen werden immer weitere Chromosomen ausgeschleust (48), und die Fähigkeit Immunglobulin zu sezernieren geht dabei häufig verloren (2, 33, 47, 52). Dies geschieht obwohl, wie C. M. Croce u.a. (14) nachwiesen, die menschlichen Chromosomen 14 und 22 mit den Genen für schwere Ig-Ketten und die λ -Ketten bevorzugt im Genom des Hybridoms verbleiben und nur das Chromosom 2 mit den Genen für die κ -Ketten zu den häufig ausgeschleusten Chromosomen gehört.

Auch mit dieser Methode wurden wertvolle monoklonale Antikörper gewonnen, zum Beispiel gegen Gliomzellen (52) oder Zellen eines Mammacarcinoms (47).

Schließlich sind auch Kombinationen der EBV- und der Hybridomtechnik angewandt worden, um die Vorteile beider Verfahren zu nutzen. LCL werden mit natürlich Ouabain resistenten, HGPRT-defizienten Maus-Myelomzellen fusioniert und in HAT-Ouabain-Selektionsmedium kultiviert. Die Sekretionsrate kann dadurch erhöht werden. Oder es werden EBV-transformierte Linien mit einer Ouabain-resistenten, HGPRT-defizienten humanen Zelllinie fusioniert, und in HAT-Ouabain-Selektionsmedium kultiviert. Dadurch würde in erster Linie die Stabilität verbessert (27). Ouabain-Resistenz ist eine dominante Eigenschaft und ermöglicht die Selektion der Hybridome gegen die LCL Zellen.

Bemerkenswert ist, daß dabei nicht nur die Sekretion der LCL's gesichert werden kann, sondern auch von nicht-sekernierenden LCL's Ig-produzierende Hybridome erhalten werden können (36)

Das Hauptproblem bei der EBV-Technik wie bei der Xenofusion ist, daß die erhaltenen Zelllinien in ihren Sekretionseigenschaften instabil sind. Auch die Kombination beider Techniken bringt darin keinen Vorteil.

Die Alternative dazu ist die human-humane Fusion, die stabile intra-Spezies-Hybridome liefert.

Die Kombination der humanen Fusion mit der EBV Transformation scheint mir dem gegenüber nicht mehr sinnvoll, da neben zusätzlichem Aufwand für die Transformation auch noch ein komplizierteres Fusionsystem nötig ist für diese doppelte Selektion.

4.1.2. Mögliche Formen der humanen Fusion

Elektrofusion von Einzelzellen

R. Bischoff u. a. (3) entwickelten ein Verfahren, bei dem unter Sicht im Mikroskop einzelne Myelom und B-Zellen mit Hilfe eines inhomogenen elektrischen Feldes perin-
ner Feldstärke in engen Kontakt gebracht werden, und dann durch Impulse sehr großer Feldstärke die Zellfusion einleitet wird. Die optische Kontrolle und die Möglichkeit primär zu klonieren, machen dabei ein besonders selektionsverfahren überflüssig.

Bei zwei anderen Methoden verhindert die Vorbehandlung der Myelomzellen weiteres Wachstum nicht fusionierter Zellen.

Cytochalasin B

In Gegenwart dieser aus bestimmten Pilzen zu gewinnen-
den Substanz (36) lassen sich Zellen in einen kernlosen
Zellkörper (Zytoplast) und den, nur mehr von einem
schmalen Zytoplasmasaum umgebenen Zellkern (Karyoplast)
auftrennen. Zytoplasten und Karyoplasten bleiben Stun-
den bis Tage vital, während aus ihnen rekonstituierte
Zellen funktions- und teilungsfähig bleiben, selbst
wenn sie von verschiedenen Zelltypen und aus verschiede-
nen Spezies stammen (30).

J. Ohara und T. Watanabe (39) stellten von Maus-Lympho-
zyten durch Dichtegradientenzentrifugation hochgereinigte
Karyoplastenfraktionen her und wiesen ihre Funktions-
fähigkeit nach PEG-Fusion mit Mitomycin C behandelten
Lymphozyten nach. (60)

Vorausgesetzt, es können die Karyoplasten sauber genug
von teilungsfähigen Myelomzellen getrennt werden, dann
wäre ein Fusionssystem möglich ohne nachträgliche Selektion
mit Enzymmarkern.

DEPC (Diethylpyrocarbonat)

W.E. Wright beschreibt ein Verfahren, die Elternzellen
mit verschiedenen Stoffwechselgiften vorzubehandeln, so
sie für sich nicht mehr regenerationsfähig sind und ab-
sterben. Werden sie jedoch fusioniert, so ergänzen sich
die unterschiedlich geschädigten Enzymsysteme und Orga-
nellen der Elternzellen, und Hybridome können weiter
wachsen (61). S. A. Clark u. a. (11) behandelten ent-
sprechend Zellen der Linie RPMI 8226 mit DEPC und fusio-
nierten sie anschließend mit PWM stimulierten FBM.

Eigene Versuche in der 19. und 26. Fusion (siehe Kurz-
protokolle), W1-L2 Zellen mit DEPC vorzubehandeln und
mit fünf Tage mit PWM stimulierten FBM zu fusionieren,

fürhten zu den Hybridomen 19.3B5 und 26.50E2 (Tabelle 15). Allerdings ist der Bereich recht schmal, in dem nicht fusionierte Zellen sicher teilungsunfähig sind, fusionierte Zellen dagegen mit großer Wahrscheinlichkeit vitale Hybridome bilden. Die geeignete DEPC Konzentration muß von Fusion zu Fusion neu bestimmt werden (61).

Diesen wenigen Untersuchungen mit Cytochalasin B und DEPC zur Gewinnung von Hybridomen stehen umfangreiche Erfahrungen mit HGPRT-defizienten Zelllinien und Selektionsmedien gegenüber. Für die Maus-Fusion ist die Selektion mit HAT Medium zum Standardverfahren geworden. Die Fusion mit PEG scheint nach dem heutigen Stand der Forschung das zuverlässigste Verfahren der B-Zellfusion zu sein.

4.2. Etablierung eines human-humanen Fusionssystems

4.2.1. Auswahl des Fusionspartners

D. Kozbor und J. C. Roder (28) geben einen Überblick über bisher für human-humane Fusionen eingesetzte Zelllinien. Erst sehr selten konnten menschliche Myelomzellen an die Gewebekultur adaptiert werden. Daraus wurde bisher keine HGPRT-defiziente Variante etabliert mit ähnlich guten Eigenschaften, wie sie zum Beispiel die Linie X63.A8.653 für die Maus-Fusion besitzt. Deshalb werden auch einige von lymphoblastoiden Zellen für die humane Fusion benutzt.

Im Vergleich zu Plasmazellen verfügen sie nur über wenig rauhes endoplasmatisches Retikulum, und der Golgi-Apparat ist nur spärlich entwickelt. Entsprechend ist mit geringeren Ig-Sekretionsraten auch bei den Hybridomen

zu rechnen.

P. G. Abrams u. a. (1) vergleichen Fusionsfrequenz und Sekretionsrate von sechs humanen Zelllinien und der Mauslinie NS 1 in Fusionen mit leukämischen Zellen eines CLL-Patienten. Am besten bewähren sich dabei die von Wi-L2 abgeleiteten Linien UC 729-6 und UC 729 HF₂ sowie Licr-Lon-HMy2.

Ich benutzte Wi-L2 729 HF₂ (55) für Fusionen aus zwei Gründen: Bei der niedrigen Sekretionsrate von unter 10 ng/ml für Wi-L2 kann mit einem ELISA für humanes Immunglobulin leicht auf sezernierende Hybridome hin getestet werden. Licr-Lon-HMy2 produziert dagegen selbst 200 ng/ml.

Der zweite Grund ist, daß ich bei Licr-Lon-HMy2 einen spontanen Anstieg der Chromosomenzahl auf über 70 beobachtete, wie ihn auch M. J. O'Hare u. a. (23) für einzelne Subklone beschreiben. Dies hätte die Unterscheidung von spontan etablierten LCL's und Revertanten von echten Hybridomen anhand der Chromosomenzahl erschwert.

Die Suche nach Fusionspartnern mit höherer Fusions- und Sekretionsrate scheint aber weiter lohnend.

4.2.2. Fusionable Lymphozyten

Abhängig von der Fragestellung sind menschliche Lymphozyten aus peripherem Blut, Tonsillen, Milz, Lymphknoten und Tumorgewebe zur Fusion verwandt worden, sowie leukämische Zellen aus der B-Zellreihe und EBV-transformierte Zellen.

Peripheres Blut ist leicht zu erhalten, enthält aber nur relativ wenige und zumeist ruhende B-Lymphozyten.

Teile einer menschlichen Milz können nur im Rahmen einer therapeutischen oder diagnostischen Splenektomie erhalten werden. Dann kann jedoch auch ein Zellvorrat eingefroren werden.

Die anderen Quellen sind wegen der möglichen Anreicherung von B-Zellen gegen bestimmte Antigene besonders interessant (36, 47, 59, 51).

Entscheidend für die Fusionierbarkeit der Zellen ist, daß sie sich in Proliferation befinden, während Ig-Sekretion nicht notwendig ist. R. Swoboda u. a. (456) wiesen dies für die Maus nach. Wahrscheinlich führt die Fusion mit PEG nur zur Verschmelzung des Zytoplasmas, während die Kerne erst verschmelzen, wenn es zu einer gleichzeitigen Mitose kommt (41).

Entsprechend konnte ich bei vergleichenden Fusionen nur mit stimulierten PBM Hybridome erhalten. Sechs Tage PWM Stimulation waren besser als vier Tage (Tabelle 12).

In der 35. Fusion mit unstimulierten PBM ließen sich wahrscheinlich nur deshalb Hybridome etablieren, weil der Spender gerade an einem inapparenten Virusinfekt litt, und vermehrt stimulierte B-Zellen im Blut vorhanden waren.

Ein Hinweis darauf ist, daß doppelt so viele PBM als gewöhnlich isoliert werden konnten, also auch die Lymphozytenzahl im Blut erhöht war.

Y. Shoenfeld u. a. (49) erzielen nach 48stündiger PWM Stimulation eine drei bis zehnfach höhere Hybridomausbeute.

H. M. Warenius u. a. (59) erreichen eine Steigerung um den Faktor drei.

G. C. B. Astaldi u. a. (2) vergleichen in Xenofusionen mit PBM-Rh-negativer Spender die Hybridomausbeute nach Stimulation mit PWM, Rh⁺-Erythrozyten und konditioniertem Medium endothelialer Zellen, sowie ihre Kombinationen. Sechs Tage Stimulation ist besser als vier Tage. Eine Steigerung über das mit PWM erreichbare Maß hinaus gelingt nicht. Ohne Stimulation sinkt die Ausbeute auf ein zehntel.

L.E. Strike u. a. (55) beobachten die maximale Hybridomausbeute mit Lymphozyten aus Tonsillen und Wi-L2 729 HF₂ nach sechs Tagen PWM Stimulation. Auch der Anteil Ig-produzierender Hybridome ist dann höher, als bei kürzerer Stimulation.

L. Chess u. a. (9) geben an, daß das Proliferationsmaximum menschlicher Lymphozyten nach PWM Stimulation, bestimmt als ^3H -Thymidinaufnahme, ihr Maximum am Tag fünf erreicht.

Um aber Hybridome zu erhalten, die Antikörper vorbestimmter Spezifität bilden, werden in der Regel weitere Maßnahmen erforderlich sein:

- Immunisation des Spenders, soweit ethisch vertretbar
- Booster-Immunisation kurz vor der Blutentnahme (6)
- Stimulation mit Mitogen und low-dose Antigen (34, 62)
- in vitro spezifische Stimulation mit dem Antigen (6, 58)
- Anreicherung spezifischer B-Zellblasten (29, 54)

Bei der ab Fusion 30 benützten Kombination von PWM und TT sind nach den Erkenntnissen von D. J. Volkman u. a. (57) keine TT spezifischen Hybridome zu erwarten. TT wirkt bei $1 \mu\text{g/ml}$ mitogen, die TT spezifische B-Zell Antwort wird jedoch unterdrückt. Optimal wären 5 ng/ml TT.

4.2.3. Das Fusionsprotokoll

Die Fusionsprotokolle der meisten Autoren sind sehr ähnlich. Für einige sind die Charakteristika in Tabelle 18 zusammengestellt.

Zu den Einzelschritten ist folgendes anzumerken:

Serum hat eine agglutinationshemmende Wirkung und wird deshalb durch zweimaliges Waschen entfernt.

Das Mischungsverhältnis der Fusionspartner stellt einen Kompromiß dar. Zu viele "Myelom"-Zellen würden die Kultur völlig überwachsen, besonders wenn erst später Selektionsmedium zugegeben wird. Ein großer B-Zellüberschuß führt dagegen bevorzugt zu Fusionen der B-Zellen untereinander.

Fazkas u.a. (17) zeigen im Maussystem, daß PEG 4000 GK der Firma Merck anderen PEG Sorten weit überlegen ist. Der Zusatz

Tabelle 18

Fusionsprotokolle

Autor	Zellen B-: "Myelom"	PEG Lösung	Zugabe - Einwirkzeit - Verdünnen	Abschluß
Shoenfeld (49)	5-10 : 1 abzentrif.	1540 Baker 44% (v/v) 23°C	0,5ml zutropfen, resuspendieren	5min 200g
Warenius (59)	10 : 1 8min 400g	PEG 1000 50% 40°C	1min 0,8ml mit 40°C zutr. 2min pip. 10,1 DMEM 37°C zugeben	10min 200g
Cote (12)	1-2 : 1 serumfrei	PEG 4000 42% (w/v) + 15% DMSO	über 3min 0,2ml zutr. bei 37°C über 5min 10ml RPMI 7,5% FCS	waschen
Olssen (40)	1 : 1 serumfrei	38% (w/v)	2ml zugeben bei 37°C	2x waschen
Chioreazzi (10)	1 : 1 abzentrif.	PEG 1000 Baker + 5% DMSO	0,4ml zugeben, 2min mischen bei RT	6min 1800RPM 1x waschen
Pickering (42)	2 : 3 serumfrei	PEG 1000 BDH 40% + 5% DMSO	1ml zugeben, nach 90s verd. mit RPMI	abzentrif. fugieren
Edwards (15)	10 : 1	PEG 1500 50%	in 1ml resusp. 5min bei 37°C, über 5min 10ml L-15 zutropfen	abzentrif. fugieren

Autor	Zellen	PEG Lösung	Zugabe - Einwirkzeit - Verdünnen	Abschluß
	B-: "Myelom"			
Abrams (1)	10 : 1 abzentrif.	PEG 1000 Baker 50%	resusp., 1ml dazu, über 6min auf 6% PEG verdünnen	abzentrif- fugieren
Pitts (45)	3 : 1 serumfrei	PEG 1000 Baker 30% 37°C	in 0,2ml 37°C resusp., 6min bewegen, 10ml RPMI 10% FCS zutropfen	abzentrif- fugieren
Mausssystem				
Facekas. (17)	1-5 : 1 abzentrif.	PEG 4000 GK Merck 50%, 5% DMSO	resusp., 0,5ml zutr., 90s bei 37°C, 20ml PBS zugeben	waschen
Geffter (19)	5min 250g serumfrei	PEG 1000 Baker 35% RT	in 0,2ml resusp., 3min 500g, nach 8min + 5ml DMEM, resusp.	5min 250g
Wi-L2 729 HF ₂				
Heitzmann (20)	2 : 1 serumfrei	PEG 4000 Merck 45%, 18% DMSO	resusp. in 1ml, 6min 37°C, langsam verd. mit RPMI	abzentrif- fugieren
Strike (55)	1 : 1 serumfrei	PEG 1000 Sigma 50%, 22°C, pH 7,55	resusp. in 1ml Rest, + 1ml PEG 3min 500g, 8min Ø resusp. 20ml RPMI	5min 350g
in dieser Arbeit	2-5 : 1 serumfrei	PEG 4000 GK Merck 44%, 5% DMSO, 37°C	1min 1ml zutr., 1min 150g, über 5min 10ml RPMI zutr. resusp.	7min 400g

von 5 % DMSO kann schädlich osmotische Effekte des PEG Mediums verringern. Beides habe ich daher übernommen.

Von Y. Shoenfeld u. a. (49) werden in einem humanen System verschiedene PEG Konzentrationen eingesetzt. 44 % hat sich dabei als bestgeeignet erwiesen.

Unter diesen Bedingungen ist PEG erst bei längerer Exposition für Wi-L2 toxisch (Tabelle 19).

Tabelle 19

Toxizität von PEG 4000 GK 44 %, 5 % DMSO

Einwirkzeit	<u>Prozent tote Zellen</u>		
	vor Fusion	nach Fusion	Differenz
0 min	15	19,5	4,5
3 min	15	22	7
10 min.	15	47	32

Je 10^6 Wi-L2 Zellen wurden serumfrei gewaschen, gezählt, und nach Fusionsprotokoll mit PEG behandelt. Nach der Zentrifugation 1 min 150 g wurde die jeweilige Einwirkzeit abgewartet, dann erst Medium zugetropft.

Das vorsichtige Zentrifugieren vor dem Ausverdünnen des PEG soll die Zellen in engen Kontakt bringen und die Aglutination der Zellen verstärken.

Bei niedrigeren Temperaturen wird die PEG Lösung sehr viskös, und in der Kälte sinkt die Fusionsrate (17).

Die Optimierung aller Parameter für dieses Fusionssystem mit Wi-L2 steht allerdings noch aus.

4.2.4. Die Kulturbedingungen

Um Kulturbedingungen zu vergleichen, hat sich der Vergleich der Limiting Efficiency junger Hybridome und des Fusionspartners unter limiting Dilution Bedingungen gut bewährt. Es entspricht den Anforderungen beim Klonieren und kommt denen bei der Zellfusion nahe. Auch eine soeben fusionierte Hybridomzelle muß als Einzelzelle beginnend in einem relativ großem Kulturgefäß zu einer Kolonie heranwachsen. Darüber hinaus sind sie dem selektiven Medium ausgesetzt, und es befinden sich noch sehr viele absterbende Zellen im Gefäß, die möglicherweise wachstumshemmende Stoffe freisetzen.

Die Ergebnisse der limiting Dilution Kulturen werden durch die Fusionsexperimente bestätigt und ergänzt.

4.2.4.1. Feeder Layer und konditionierte Medien

Die untersuchten Feeder Layer sind den entsprechenden konditionierten Medien überlegen. Ohne Feeder Layer konnten keine Hybridome etabliert werden (Tabelle 3).

P.A.W. Edwards u. a. (15) setzen am Tag 1 nach der Fusion $1 \cdot 10^5$ PEC pro Well zu und erhalten so 5mal so viele Hybridome. L. E. Strike u. a. (55) verwenden $1 \cdot 10^4$ humane Thymusfibroblasten je Well, und J. G. Heitzmann u. a. (20) verwenden $3 \cdot 10^4$ PEC je Well, in Fusionen mit Wi-L2.

L. Olsson u. a. (41) benützt $1-5 \cdot 10^5$ menschliche Monozyten oder $1 \cdot 10^5$ Thymuszellen vom Menschen oder der Maus. Maus PEC sollen im System dieser Autoren einen negativen Effekt haben, vielleicht weil sie nicht nur tote Zellen sondern auch junge Hybridome phagozytieren.

In dem hier beschriebenen System bewähren sie sich jedoch gut. In einem direkten Vergleich mit Fibroblasten als Feeder Layer (Tabelle 4) sind PEC sogar deutlich überlegen.

4.2.4.2. Auswahl des Serums

Unterschiede zwischen verschiedenen FCS Chargen werden mit limiting Dilution deutlicher sichtbar als in Massenkulturen. Die Ergebnisse stimmen mit dem von Frau G. Wildner in Xenofusionen ermittelten überein, und die so ermittelte Charge hat sich in der humanen Fusion hervorragend bewährt (Tabelle 6).

Auch R. J. Cote u. a. (12) betonen die Bedeutung der FCS Charge für den Fusionserfolg.

M. J. O'Hare u. a. (23) empfehlen ebenfalls die Kultur junger Hybridome unter limiting Dilution, um die für Fusionen bestgeeignete Charge zu ermitteln.

Medium mit Humanserum hat sich dagegen in meinen Fusionen mit Wi-L2 nicht bewährt (Tabelle 7). Es hätte auch wesentlich mehr Aufwand für die Mediumherstellung erfordert, und das enthaltene Immunglobulin hätte das Testen der Hybridome sehr erschwert.

Eventuell kann das Medium durch weitere Zusätze in seinen Eigenschaften weniger vom FCS abhängig gemacht werden.

N. N. Iscove und F. Melchers (24) konnten zum Beispiel für die Polysaccharidstimulation von Maus b-Zellen das Serum völlig ersetzen.

Zu denken ist dabei an Produkte des Intermediärstoffwechsels wie Oxalacetat, Pyruvat, Mercaptoethanol, einzelne Serumfaktoren wie albumin und Transferrin, an Vitamine, Coenzyme und Hormone wie Insulin. Dem selektiven Medium müssen manche Bestandteile in größerer Menge zugesetzt werden, um das Hybridomwachstum zu fördern, zum Beispiel nicht essentielle Aminosäuren.

Y. Shoenfeld u. a. (49) geben zum Medium noch Insulin, Oxalacetat, NCTC 109 und NEAA dazu.

Tabelle 20 Kulturbedingungen nach der Zellfusion

Autor	Zelldichte, ($\cdot 10^5$ /Well)	Wells, Feeder, Medium	Selektionsmedium	Fütterungs- abstand
Shoenfeld (49)	2 Z	g, k -	Ø für 24 h abzent. aufn. in HAT	5 d
Warenus (59)	70 Z	k -	Ø für 24 h HAT, Tag 10 auf je 4 Wells teilen	
Cote (12)	1-2 L	k +	HT für 24 h HAT	7 d
Pickering (42)	2,5 Z	k -	primär Kultur in HAT	7 d
Ritts (45)	2,5 Z	g -	HT für 24 h, + gleiche Menge HT 1x, A 2x	7 d
Chiorazzi (10)	1 Z	-	HT für 24 h, + A	3 d
Abrams (1)	2,5 M	k	primär Kultur in HAT	
OJsson (41)	2 Z	k +	HT für 24-48 h, abpipettieren, HAT zugeb.	5 d
Edwards (15)	2 M	g +	primär Kultur in HAZAT	7 d
Larrick (34)	1 Z	k -	Ø für 24 h, HAZA	3 d
Sikora (51)	4-8 Z	g -	Ø für 24 h, HAT	1 d

Z : Zellen, L : Lymphozyten M : "Myelom"-Zellen K : 0,2 ml Wells g : 2ml Wells

Ø : Kulturmedium ohne Selektionszusätze

Tabelle 20 Fortsetzung

Autor	Zelldichte, Wells, Feeder, Medium ($\cdot 10^5$ /Well)	Selektionsmedium	Fütterungs- abstand
Xenofusion			
Astaldi (2)	1,5 Z k	- Ø für 24 h, gleiche Menge HAT 2x dazu	2/7 d
Butler (6)	3-5 Z k	- Ø für 24 h, in 100 ul, + 125 ul HAT	3 d
W1-L2 729 HF ₂			
Heitzmann (20)	2/20 Z k/g	+ Ø für 24 h HAT zugeben	3-4 d
Strike (55)	5-10 L g	+ Ø für 24 h, abzentrif, aufn. in HAT	3 d
eigene Schemata			
4-8 L g	+	Ø für 24 h, füttern mit HAZA Tag 1,2,3,	7 d
4-8 L g	+	primär Kultur in HAZA	7 d

Z : Zellen L : Lymphozyten M : "Myelom"-Zellen K : 0,2 ml Wells g : 2 ml Wells
 Ø : Kulturmedium ohne Selektionszusätze

4.2.4.3. Die Zelldichte

Die von mir gewählte Zelldichte von $4-8 \cdot 10^5$ Zellen je 2 ml Well ist mit der in anderen Arbeiten benützten vergleichbar (Tabelle 20). Viele Autoren verwenden 0,2 ml Mikrowells mit etwa ein fünftel Bodenfläche eines 2 ml Wells. Y. Shoenfeld u. a. (49) erhalten bei $2 \cdot 10^5$ Zellen je Well mehr Hybridome in den größeren Wells. J. L. Butler u. a. (6) finden für die Xenofusion $3-5 \cdot 10^5$ Zellen je Mikrowell optimal. Fazekas u. a. (17) zeigen, daß die Zelldichte mit Feeder Layer auch niedriger gewählt werden kann (beziehungsweise bei gleicher Zellzahl ein größeres Gefäß).

J. G. Heitzmann u. a. (20) beobachten für Wi-L2 ein deutliches Absinken der Fusionsfrequenz, wenn in 0,2 ml Wells mit PEC Feeder Layer weniger als $2 \cdot 10^5$ Zellen gefüllt werden.

4.2.4.4. Die Wahl des Selektionsmediums, HAT oder HAZA

Das gebräuchlichste Selektionsmedium in der Mausfusion ist HAT-Medium in der von J. W. Littlefield (37) angegebenen Zusammensetzung. Dieses Medium wurde von vielen Untersuchern auch für die humane Fusion übernommen oder leicht modifiziert (Tabelle 21).

L. Olsson verwendet in einer Arbeit (40) Amethopterin statt Aminopterin.

P. A. W. Edwards u. a. (15) verwenden dagegen Azaserin anstatt Aminopterin, J. W. Larrick u. a. (34) lassen Thymidin weg und verwenden eine 20fach höhere Azaserinkonzentration als Edwards.

Bei G. Buttin u. a. (7) erweist sich HAZA-Medium dem HAT-Medium in einem Maussystem überlegen.

Tabelle 21

Zusammensetzung der Selektionsmedien

Autor	Hypoxanthin	Thymidin	Aminopterin
Shoenfeld (49)	1 x	1 x	1 x
Croce (28)	1 x	1 x	1 x
Warenius (59)	1 x	1 x	1 x
Cote (12)	1 x	1 x	1 x
Strike (55)	1 x	1 x	50 x
Pickering (42)	1 x	1 x	1 x 3 μ M Glycin
Ritts (45)	1 x	2 x	1 x
Chiorazzi (10)	1 x	3 x	0,25 x
Abrams (1)	1 x	2 x	25 x
Olssen (41)	1 x	0,25 x	0,05 x
Olssen (40)	0,01 x	0,1 x	63 nM Amethopterin
Edwards (15)	1 x	1,3 x	0,4 μ g/ml Azaserin
Larrick (34)	1 x		8 μ g/ml Azaserin
Buttin (7)	0,5 x		1,73 μ g/ml Azaserin
eigenes HAT	2 x	2 x	1 x
eigenes HAZA	1 x		0,4 μ g/ml Azaserin

nach Littlefield (37):

Hypoxanthin : 1 x = 100 μ M = 13,6 μ g/ml
 Thymidin : 1 x = 16 μ M = 3,88 μ g/ml
 Aminopterin : 1 x = 0,4 μ M = 0,176 μ g/ml

Ich konnte in dieser Arbeit zeigen, daß HAZA-Medium in der von Edwards angegebenen Zusammensetzung, jedoch ohne Thymidin, in Fusionen mit Wi-L2 entscheidende Vorteile bringt, auch gegenüber einem für Wi-L2 optimiertem HAT-Medium.

Die Überlegenheit des HAZA-Mediums wird aus dem biochemischen Wirkmechanismus verständlich. Beide Selektionsmedien greifen in den Purin Stoffwechsel der Zellen an zentraler Stelle ein, wie Tabelle 22 verdeutlicht.

Aminopterin ist ein Analoges der DHF (Dihydrofolsäure) (Tabelle 23). Es hemmt kompetitiv die Reduktion von DHF zu THF (Tetrahydrofolsäure) durch die DHF-Reduktase, mit der es eine irreversible Bindung eingeht (43). Dadurch sinkt die THF-Konzentration in den Zellen ab.

Besonders empfindlich reagiert darauf die Thymidylsäure-Oxidase, welche die Methylierung von dUMP zu dTMP katalysiert. Dies wird durch die Zugabe von Thymidin zum Selektionsmedium ausgeglichen (43).

Weiter davon betroffen sind die beiden Enzyme der Purinsynthese Phosphoribosyl-glycinamid-formyltransferase und Phosphoribosyl-aminoamidazylcarboxamid-formyltransferase, die Methenyl-THF beziehungsweise Formyl-THF als Coenzyme benötigen (25). Die Purinbiosynthese wird so blockiert.

THF wird aber auch an anderen Stellen des Zellstoffwechsels bei der Übertragung von C_1 -Fragmenten benötigt, z. B. auch bei der Pyrimidinsynthese.

Möglicherweise gedeihen deshalb auch Zellen mit dem Enzym H^gPRT in HAT-Medium nur schlecht.

Auch wird eine wachstumshemmende Wirkung von Thymidin beschrieben (46).

Tabelle 22 a

Bildung von Purinnukleotiden

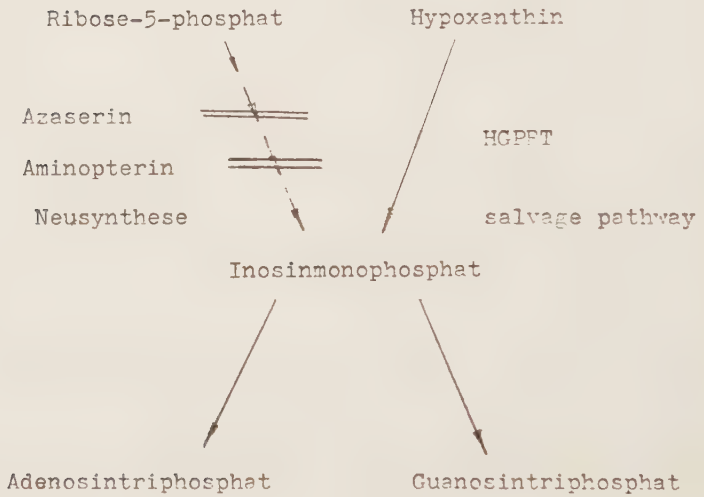


Tabelle 22 b

Purinneusynthese

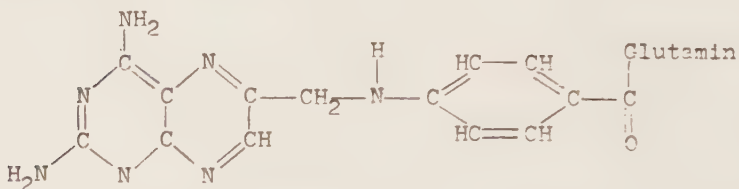
Ribose-5-phosphat	ATF $\rightarrow$ AMF
↓	Ribosephosphat-pyrophosphokinase
5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat	Glutamin $\rightarrow$ Glutamat + PP
↓	Phosphoribosyl-pyrophosphat-amidotransferase
5-Phosphoribosylamin	Glycin + ATF $\rightarrow$ P
↓	Phosphoribosyl-glycinamid-synthetase
Glycinamid-ribotid	Formyl-THF $\rightarrow$ THF
↓ a)	Phosphoribosyl-glycinamid-formyltransferase
Formylglycinamid-ribotid	Glutamin + ATF $\rightarrow$ Glutamat
↓ b)	Phosphoribosyl-formylglycin-synthetase
Formylglycinamidin ribotid	ATP $\rightarrow$ ADP + P
↓	Phosphoribosyl-aminoimidazol-synthetase
Aminoimidazol-ribotid	$\rightarrow$ CO ₂
↓	Phosphoribosyl-aminoimidazol-carboxylase
Aminoimidazol-carboxyl-säure-ribotid	Aspartat + ATF $\rightarrow$ ADP + P
↓	Phosphoribosyl-aminoimidazol-succinocarboxamid-synthetase
Aminoimidazol-succinocarboxamid-ribotid	$\rightarrow$ Fumarat
↓	Adenyl-succinat-lyase
Aminoimidazol-carboxamid-ribotid	Formyl-THF $\rightarrow$ THF
↓ a)	Phosphoribosyl-aminoimidazol-carboxamid-formyltransferase
Formamidoimidazol-carboxamid-ribotid	$\rightarrow$ H ₂ O
↓	Inosinmonophosphat-cyclohydrolase
Inosinmonophosphat	

a) Hemmung durch Aminopterin

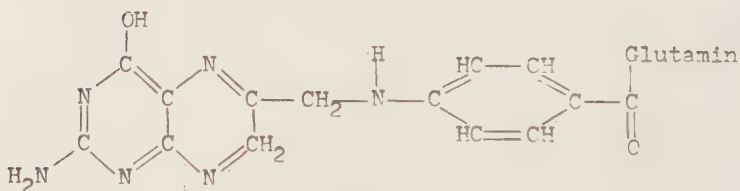
b) Hemmung durch Azaserin

Tabelle 23

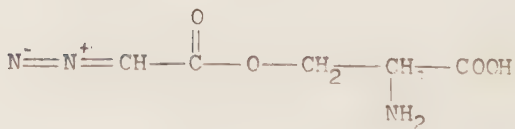
Hemmstoffe im Purinstoffwechsel und ihre Analoga



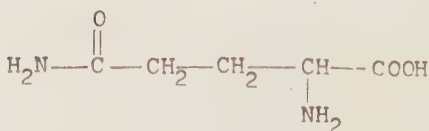
Aminopterin



Dihydrofolsäure



Azaserin



Glutamin

Azaserin ist in der Struktur dem Glutamin analog (Tabelle 23). Es wurde 1954 von J. Ehrlich u. a. in Kulturfiltraten zweier Streptomycesarten entdeckt (44). Die Substanz ist wasserlöslich und relativ labil bei Ph-Werten unter 6 und über 7. Sie besitzt ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 250,5 nm. Im Gewebe wird sie enzymatisch abgebaut, wahrscheinlich beginnend mit einer Desaminierung. Aktiv ist nur das L-Azaserin. In verschiedenen biologischen Systemen wirkt Azaserin wachstumshemmend, teratogen und in höheren Dosen tödlich (44). J. M. Buchanan (5) konnte als Angriffspunkt die Phosphoribosyl-formylglycinamid-Synthetase identifizieren. Aus der Enzymkinetik läßt sich ableiten, daß Azaserin und Glutamin um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum des Enzyms konkurrieren, und dort Azaserin über eine SH-Gruppe kovalent gebunden wird. Um andere Enzyme der Purinsynthese zu hemmen, sind weit höhere Konzentrationen erforderlich (5). Auch verschiedene andere Autoren (38, 57) zeigen, daß andere Reaktionen, an denen Glutamin beteiligt ist, weit weniger sensitiv auf Azaserin reagieren.

Der Vorteil des HAZA-Mediums beruht also wahrscheinlich darauf, daß Azaserin selektiver wirkt als Aminopterin.

Einige Schwierigkeiten bereitete zunächst die Instabilität des Azaserins und damit der Verlust der Selektivität einige Wochen alten HAZA-Mediums. Lichtgeschütztes Aufbewahren aller Azaserin enthaltender Lösungen und HAZA wöchentlich frisch anzusetzen, ließen aber solche Probleme nach der 30. Fusion nicht mehr auftreten.

4.2.4.5. Zuzabe des selektiven Mediums

Wie aus Tabelle 20 hervorgeht, bevorzugen die meisten Autoren, das selektive Medium erst am Tag nach der Fusion zuzugeben. Damit soll den PEG-agglutinierten Zellen wenig-

stens bis zur ersten Teilung günstigere Bedingungen geschaffen werden.

Aber auch das Herausnehmen aus den Brutschränken und Füttern (Y. Shoenfeld u. a. (50) und L. E. Strike u. a. (55) zentrifugieren die Zellen sogar ab) führt zu CO_2 -Schwankungen und Temperatursprüngen und somit zu zusätzlichem "Stress" für die jungen Hybridome.

Da sich die beiden von mir untersuchten Verfahren, HAZA-Zugabe durch wiederholtes Füttern an den Tagen 1, 2 und 3 oder primär Kultur in HAZA-Medium, etwa gleich gut bewährt haben, bevorzuge ich die materialsparende und weniger arbeitsaufwendige primäre Kultur in Selektionsmedium.

Wöchentliches Füttern bis zum Sichtbarwerden der ersten Hybridome erweist sich ebenfalls als ausreichend.

4.3. Eigenschaften des Fusionssystems

4.3.1. Nicht-Hybridomlinien - echte Hybridome

Durch den Einsatz von HAZA Selektionsmedium, einer für Hybridomkulturen getesteten FCS Charge und Feeder Layern gelingt nun regelmäßig die Etablierung neuer Zelllinien.

Bis zur 30. Fusion waren darunter eine Reihe diploider Zelllinien, also gesicherte nicht-Hybridome.

Bei späteren Fusionen wurde das Selektionsmedium nicht mehr ausverdünnt und kein Selektionsmedium benutzt, das älter als eine Woche war. Diploide Zelllinien traten dann nicht mehr auf.

Deshalb handelte es sich bei diesen nicht-Hybridomen am ehesten um überlebende Wi-L2 Zellen, die sich in nicht mehr selektivem Medium weiter vermehrten.

Es muß sich dabei keineswegs um HGPRT-positive Revertanten handeln. P. A. W. Edwards u. a. (15) berichten, daß

die Zelle Licr-Lon-HMy2, obwohl HAT-sensitiv, mehrere Wochen in HAZAT Medium überleben kann.

Wi-L2 wird regelmäßig in 8-Azaguanin passagiert, und bisher haben wir keine Revertanten beobachtet.

Möglicherweise sind unter den nicht-Hybridomen auch EBV-transformierte B-Zellen. Wi-L2 ist EBNA-positiv, soll aber keine Viren freisetzen (20). Bei keinem der nicht-Hybridome war Immunglobulin im Überstand nachweisbar.

Da die meisten dieser Zelllinien nach wenigen Wochen spontan zu wachsen aufhörten, und einige eingefrorene Zellen nach dem Auftauen nicht wieder in Kultur genommen werden konnten, war ihre eingehendere Untersuchung nicht möglich.

Daß sich unter den annähernd tetraploiden Linien noch weitere nicht-Hybridome befinden, ist recht unwahrscheinlich. Denkbar wären tetraploide Varianten von LCL-Linien oder tetraploide Varianten einer Revertante von Wi-L2, sowie es hyperdiploide, HAT-sensitive Varianten der Linie Licr-Lon-HMy2 gibt (9).

Für die Hybridnatur der Zellen und gegen die Annahme, daß es sich um hyperdiploide Zellen ganz anderer Natur handelt, spricht auch, daß ein Teil von ihnen Immunglobulin produziert und für den Klon 7D4D7D5 zwei leichte und zwei schwere Ig-Ketten nachweisbar sind.

Ein weiteres Argument für die Hybridnatur könnte durch die Bestimmung der HLA-Antigene auf den Hybridomen, Wi-L2 und Lymphozyten des Blutspenders gewonnen werden.

Hybridome sollten HLA-Antigene beider Elternzellen tragen. Die HLA-Typisierung lymphoblastoider Zelllinien und von Hybridomen ist jedoch technisch schwierig.

L. E. Strike u. a. (55) geben für Wi-L2 die Typisierung A 1, A 2, B 5, B 17, C 6, DR 7 an.

4.3.2. Die Fusionsfrequenz

In Tabelle 24 sind die Fusionsfrequenzen mehrerer humaner Fusionssysteme angeführt, soweit sie in den Arbeiten genannt werden oder aus den Angaben über Fusionsverhältnis, Zelldichte und den Anteil hybridompositiver Wells zu berechnen sind.

Beim Vergleich sind verschiedene Punkte zu berücksichtigen:

- Welche B-Zellquelle wurde benutzt (40)
 - Handelt es sich um ein Einzelergebnis oder Durchschnittswerte
 - enthalten alle positiv gewerteten Wells Hybridome
 - stellen viele Hybridome frühzeitig das Wachstum ein
 - wie viele Hybridome sehen beim Klonieren verloren
- (L. Olsson u. a. (41) : nur 3 von 21 ließen sich klonieren)

Der für diese Arbeit errechnete Wert von $1,3 \cdot 10^5$ fusionierten B-Zellen je erhaltenem Hybridom basiert auf fünf Teilexperimenten. Als Hybridome wurden nur Kulturen gewertet, die erfolgreich expandiert und deren Karyotyp bestimmt wurde.

In drei Arbeiten wird die Fusionsrate der humanen Fusion mit der Xenofusion verglichen.

R. J. Cote u. a. (12) sehen einen Unterschied um den Faktor 8 bis 20, P. C. Abrams u. a. (1) sehen in der Xenofusion eine 3fach höhere Fusionsrate. Sogar der Maus Fusion vergleichbare Raten, werden beschrieben (20, 34).

Wird nicht nur das initiale Wachstum bewertet, sondern einige Wochen weiter beobachtet, so ist auch das hier beschriebene Fusionsverfahren mit Wi-L2 der Xenofusion mit X63.A.8.65 vergleichbar, oder ihr überlegen, wie aus einem singulären Experiment zu ersehen ist (Tabelle 25)

Tabelle 24

Fusionsfrequenz und Sekretionsrate

	fusionierte Lymphozyten je Hybridom ($\cdot 10^6$)	davon Is- produzierend (%)	Sekretions- rate (uσ/ml)
Shoenfeld (49)	0,2	25 spezif.Is.	1 - 15
Warenius (59)	2,3		
Cote (12)	0,04 - 10	20 - 80	0,5 - 100
Pickering (42)	0,47	75	3 - 10
Ritts (45)	0,075 je Producer		
Chiorazzi (10)	0,5	20 - 70	0,1 - 5
Abrams (1)			
UC 729 HF ₂	1,0	25	0,8 - 1,6
Lier-Lon-HM2	4,0	50	0,8 - 1,6
Olsson (40)	0,14	40	3 - 11
Edwards (15)	10	50	0,25 - 2
Sikora (51)	0,7		
Larrick (34)	0,06	50	1 - 5
Heitzmann (20)	0,01 - 0,1		5 - 20
in dieser Arbeit	1,3	40	0,02 - 0,5

Tabelle 25

Vergleich humane Fusion - Xenofusion

Fusionspartner	Wells mit Wachstum nach		
	2 Wochen	3 Wochen	4 Wochen
W1-L2	6/48	10/48	10/48
X63.Ar8.653	14/48	6/48	5/48

Entsprechend stimulierte B-Zellen aus peripherem Blut eignen sich fast ebenso gut (10, 49) oder gleich gut (12, 15) wie Fusionspartner aus festen Geweben.

R. J. Cote u. a. (12) beobachten bei den Hybridomen unterschiedliche Verteilung der Ig-Klassen je nach B-Zellquelle.

Meist bilden nur sehr wenige Hybridome Antikörper einer gesuchten Spezifität und eine Steigerung der Fusionsrate ist in jedem Fall anzustreben.

Hierzu kann das Fusionsprotokoll weiter optimiert und das Kulturmedium wie bereits angeführt angereichert werden.

Mycoplasmenkontamination der Elternzelle vermindert wahrscheinlich die Fusionsfrequenz, und die Verwendung von mycoplasmenfreien Linien sollte angestrebt werden.

Die in dieser Arbeit benutzte Wi-L2 Linie ist noch mit Mycoplasma hyorhinis kontaminiert.

R. E. Ritts u. a. (45), P. A. W. Edwards u. a. (15) und P. C. Abrams u. a. (1) geben an, mycoplasmenfreie Fusionspartner zu verwenden.

4.3.3. Wachstum und Sekretionseigenschaften

So schwierig sich die Etablierung der Hybridome in dieser Arbeit darstellt, erscheinen die Wuchseigenschaften der Hybridome dann eher günstig und stabilisieren sich mit fortschreitender Kulturdauer.

Die Verdoppelungszeit ist mit 30 bis 36 Stunden länger, als bei der Elternzelle, eine Beobachtung die auch in anderen Systemen gemacht wird (15, 34).

In dichteren Kulturen mit $2 \cdot 10^4$ bis $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml wachsen die Hybridome auch ohne Feeder Layer, in 2 ml-Wellis wie in 75 cm² Plastikkulturflaschen. Die Klone 15.1B105

und 30.3C2 wurden auch in 1000 ml Roller Bottles gezogen und produzierten auch bei reduziertem FCS Anteil Antikörper.

Auf Feeder Layern können die Hybridome effizient kloniert werden, wenn wie bei den Methoden beschrieben vorgegangen wird.

Eingefrorene Hybridome ließen sich alle wieder problemlos in Kultur nehmen.

Die Sekretionsrate meiner Hybridome ist mit 20 - 500 ng/ml niedriger als in vielen anderen Systemen (Tabelle 24).

Mit drei Hybridomen versuchte ich die Sekretionsrate durch Zugabe von TPA zu erhöhen (Tabelle 26).

In den Überständen von zwei Hybridomen ist nach Kultur mit TPA mehr Immunglobulin enthalten. Mit TPA wachsen die Zellen mehr adhärent und Vitalität und Wachstum sind beeinträchtigt, so daß es sich möglicherweise um freigesetztes intrazelluläres Immunglobulin handelt. R. E. Ritts u. a. (45) sehen mit TPA eine verminderte Ig-Sekretion.

Tabelle 26

Steigerung der Ig-Sekretion mit TPA

Ausgangszelldichte 5.10 ⁴ /ml	nach 72 h (.10 ⁴ /ml)	tote Zellen (%)	Immunglobulin (ng/ml)
Ø	25	25	30
30.3C2			
TPA	30	30	100
Ø	24	15	50
7D4D7D5			
TPA	24	25	50
Ø	20	25	100
36.6.7C1			
TPA	8	50	200

TPA : 4-B-Phorbol-12-B-Myristate-13-d-Acetat (Sigma, P-8139) in Ethylacetat gelöst, zu 25 µl aliquotieren und das Lösungsmittel verdunsten lassen. Aufbewahrung bei -20° C. In 100 µl Aceton p. a. lösen, mit 10 ml Kulturmedium verdünnt als 1000 x Stammlösung verwenden.

Aus entsprechend großen Kulturen ließen sich aber affinitätschromatographisch auch Antikörpermengen im Milligrammbereich gewinnen.

Außerdem besteht die Möglichkeit nackten Mäusen Hybridomazellen intraperitoneal zu injizieren und höher konzentrierten Antikörper aus Peritonealexsudat zu gewinnen.

E. T. Kenneth u. a. (25) gelingt dies, nach subcutaner Adaptation der Hybridome in nackten Mäusen.

4.4. Charakterisierung des Immunglobulins

Von zwei Hybridomen wurde das produzierte Immunglobulin affinitätschromatographisch angereichert und mit spezifischen Antisera in der Doppelimmundiffusion untersucht.

Für 15.1B1C5 läßt sich γ_2 , κ nachweisen. Für Wi-L2 wird IgG, κ angegeben (55). Das Immunglobulin des Klons 7D4D7D5 reagiert dagegen mit anti- κ , anti- λ , anti- α , und anti-IgG, produziert also eindeutig auch neues Immunglobulin.

Die Untersuchung mit internal Labeling und SDS-PAGE hat dagegen kein eindeutiges Ergebnis erbracht. Einige Autoren zeigen Autoradiogramme mit Ig-Banden von Elternzellen und Hybridomen. Sie hatten aber teilweise wohl mit ähnlichen Schwierigkeiten zu tun und verwandten die gleichen Lösungsstrategien: Verwendung von ^{35}S -Methionin (34, 41, 50) und Zusatz von dialysiertem FCS (15, 34). Die hier untersuchten Hybridome produzierten in Labeling Medium noch so wenig Antikörper, daß sie auch mit der verfeinerten Methode und bei einwandfreier Auftrennung nicht eindeutig sichtbar sind.

Es bliebe noch die Möglichkeit Hybridome über einige Wochen an labeling Medium zu adaptieren.

Höhere Spezifität und Sensibilität wäre noch zu erreichen, wenn SDS-PAGE mit einer Blotting Technik kombiniert wird.

Die Banden im Polyacrylamidgel werden elektrophoretisch auf ein Nitrozellulosepapier übertragen und können dort mit einem Peroxidase gekoppelten Antikörper spezifisch markiert, und durch Zusetzen eines geeigneten Substrates sichtbar gemacht werden.

Hierfür kann auch angereichertes Immunglobulin benutzt werden.

4.5. Ausblick

Das in dieser Arbeit vorgestellte Verfahren zur human-humanen Fusion von B-Lymphozyten aus dem peripheren Blut und Wi-L2 729 HF₂ erlaubt mit hoher Frequenz stabile, antikörperproduzierende Hybridome zu erhalten mit günstigen Wachseigenschaften.

Das System ist so weit entwickelt, daß man planmäßig spezifische humane monoklonale Antikörper produzieren und damit Untersuchungen durchführen kann, für die Maus-monoklonale Antikörper weniger geeignet sind, oder humane monoklonale Antikörper bisher mit anderen Methoden und größerem Aufwand gewonnen wurden.

Etwa die Hälfte der mit Maus-monoklonalen Antikörper behandelten Patienten entwickelten eine Immunantwort gegen Maus-Ig (28). Mit humanem Immunglobulin ist eine weit geringere Rate zu erwarten.

Monoklonale Antikörper werden bereits zur Diagnose und Therapie von B-Zell Leukämien und verschiedenen Tumoren versuchsweise eingesetzt (38, 47, 52).

Menschliche Lymphozyten erkennen wahrscheinlich ein anderes Spektrum an Antigenen als Lymphozyten der Maus.

Dies kann bei der Erforschung der Transplantatabstoßung und bei Autoimmunkrankheiten bedeutend sein (50).

Auch Prophylaxe und Behandlung von Infektionskrankheiten ist ein mögliches Einsatzgebiet für monoklonale Antikörper. Mit der humanen Fusion sind bereits Antikörper gegen Masernvirus (13), E. Coli (31), Häemophilus Influenzae Typ B (21) entwickelt worden.

Zwei unabhängige Arbeiten von J. W. Larrick u. a. (34) und H. W. L. Ziegler-Heitbrock u. a. (62) beschreiben durch humane Fusion erhaltene Antikörper gegen Tetanus Toxoid. J. W. Larrick u. a. (34) können damit Mäuse gegen ein vielfaches der tödlichen Dosis TT schützen. In kurzer Zeit werden humane monoklonale Antikörper in vielen Bereichen der Medizin Anwendung finden.

Bild 2



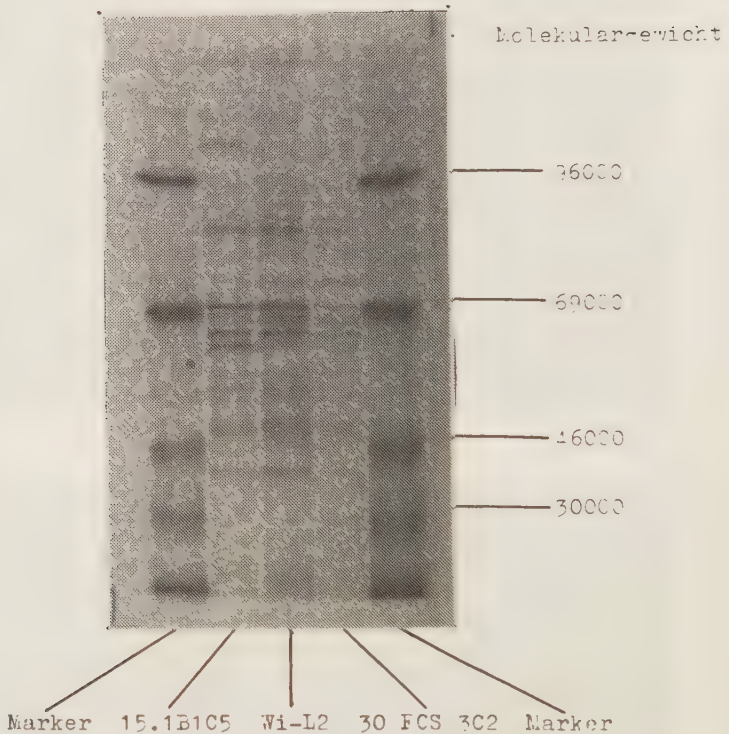
Karyotyp Wi-L2 729 HF₂



Karyotyp Hybridom 15.1B1C5

Bild 3

Internal Labeling und SDS-PAGE



Je $4 \cdot 10^6$ Zellen wurden in Selektamin mit 10 % dialysiertem FCS und 50 uCi ^{35}S -Methionin 24 h inkubiert. Die Zellen wurden 1h in NP 40, 1 % lysiert. An Sepharose 4 B gekoppeltes Ziege-anti-human- Ig wurde mit Lysat von Molt 4 Zellen vorabsorbiert. Die Zellysate wurden mit Sepharose 4 B absorbiert, dann 24 h mit der vorabsorbierten Antikörper-Sepharose inkubiert, gründlich gewaschen und elektrophoretisch getrennt. Mit dem getrockneten Gel wurde ein Kodak XAR 5 Film 96h bei -80°C belichtet

Bild 5

Doppelimmundiffusion

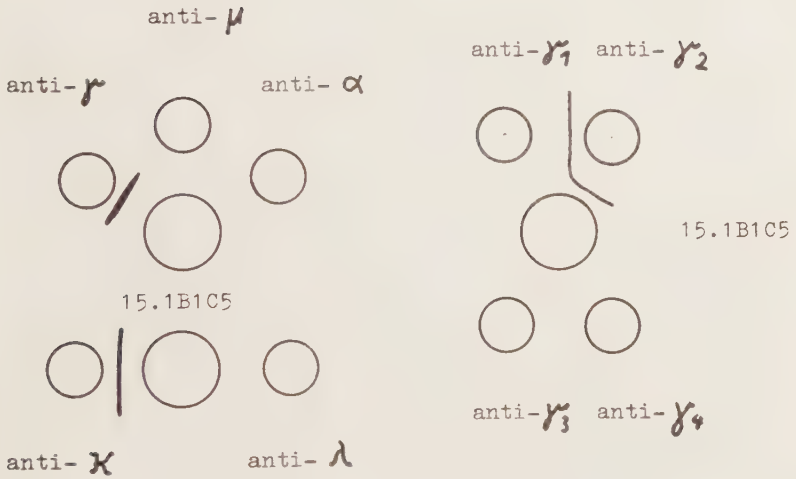
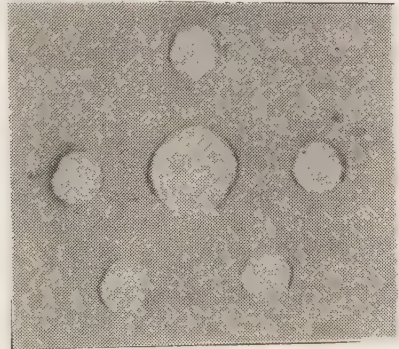
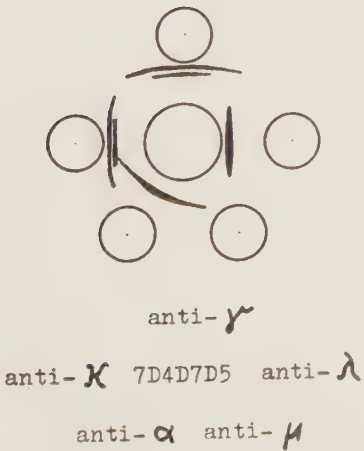


Bild 6

Doppelimmundiffusion



5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein System zur Gewinnung human-humaner Hybridome entwickelt, die monoklonale Antikörper produzieren. Als Fusionspartner dienten die lymphoblastoide Zelllinie Wi-L2 729 HF₂ und humane B-Lymphozyten, die aus venösem Blut gewonnen und sechs Tage mit Pokeweed-Mitosen stimuliert wurden. Die Zellfusion wird mit Polyethylenglycol 4000 für Gaschromatographie durchgeführt. Die Zellen werden danach in Gegenwart von Peritonealexsudatzellen aus der Maus als Feeder Layer kultiviert. Für das Kulturmedium sind nur bestimmte vorher auszuwählende Chargen fetalen Kälberserums geeignet. Die Selektion geschieht in Kulturmedium mit Hypoxanthin und Azaserin. Dies kann Zeit und Kosten sparend unmittelbar nach der Fusion zugegeben werden.

Die Fusionsrate in diesem System liegt bei etwa $1,3 \cdot 10^6$ stimulierten Zellen je erhaltenem Hybridom.

Die Hybridome enthalten typischerweise 70 bis 90 Chromosomen und wachsen auch ohne Feeder Layer mit Verdopplungszeiten zwischen 30 und 36 Stunden.

Eta 40 % der erhaltenen Hybridome produzieren Immunglobulin, 20 bis 500 ng/ml Überstand.

Nur bei 3 von 20 mehrmonatigen Kulturen ohne zwischenzeitlichem Klonieren können die Sekretionseigenschaften verloren.

Mit der Doppelimmundiffusion konnten in Überständen eines klonierten Hybridoms beide leichte Ig-Ketten sowie und -schwere Ig-Ketten nachgewiesen werden und damit die Produktion eines neuen Immunglobulins.

6. Literaturverzeichnis

- 1 P.G. Abrams, J.A. Knost, G. Clarke. S. Wilburn,
R.K. Oldham, K.A. Foon (1983)
Determination of the optimal human cell lines for
development of human hybridomas
J. Immunol. Vol. 131, No. 3, 1201-1204
- 2 G.C.B. Astaldi, E.P. Wright, C. Willems, M.C. Janssen
(1982)
Increase of hybridoma formation by human lymphocytes
after stimulation in vitro; effects of antigen,
endothelial cells, and PWM
J. Immunol. Vol. 128, No. 6, 2539-2542
- 3 R. Bischoff, J. Vienken, G. Vieten, R.M. Eisert,
H. Bodenstein, I. Schedel, U. Zimmermann (1982)
Electric field induced fusion between human myeloma
cells and human B-lymphocytes
Immunobiology 162, 4/5, 328
- 4 N. Brown, G. Miller (1982)
Immunoglobulin expression by human B-lymphocytes
clonally transformed by Epstein-Barr virus
J. Immunol. Vol. 128, No. 1, 14-29
- 5 J.M. Buchanan in
G.E.W. Wolstenholme, C.M. O'Connor (Hrsg.)
Ciba Foundation Symposium on
amino acids and peptides with antimetabolic activity
J. & A. Churchill Ltd. London 1958, 75-88
- 6 J.L. Butler, H.C. Lane, A.S. Fauci (1983)
Delineation of optimal conditions for producing
mouse-human heterohybridomas from human
peripheral blood B cells of immunized subjects
J. Immunol. Vol. 130, No. 1, 165-168

- 7 G. Buttin, G. Le Guern, L. Phalante, E.C.L. Lin,
L. Medrano, R.A. Cazenave in
F. Melchers, M. Potter, N. Warner (Hrsg.)
Lymphocyte Hybridomas, Springer-Verlag Berlin 1978, 27-36
- 8 B. Carter (1966)
Effects of Cytochalasins on Mammalian Cells
Nature, January 21, 1967, 261-264
- 9 L. Chess, R.P. MacDermott, S.F. Schlossman (1974)
Quantitative Isolation of Human T and B Cells and
Response to Mitogens
J. Immunol. Vol. 113, No. 4, 1113-1121
- 10 N. Chiorazzi, R.L. Wasserman, H.G. Kunkel (1982)
Use of Epstein-Barr virus transformed B cell lines
for the generation of immunoglobulin producing
human B cell hybridomas
J. Exp. Med. 156, 930-935
- 11 S.A. Clark, W.H. Stimson, A.R. Williamson,
H.M. Dick (1981)
Human hybrid cell lines; a new method of production
Journal of Supramolecular Structure in
Cellular Biochemistry 1981, Suppl. 5, 100a
- 12 R.J. Cote, D.M. Morrissey, A.N. Houghton,
E.J. Beattie, H.F. Oettingen, L.J. Old (1983)
Generation of human monoclonal antibodies reactive
with cellular antigens
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2026-2030
- 13 C.M. Croce, A. Linnenbach, W. Hall, Z. Steplewski,
H. Koprowski (1980)
Production of human hybridomas secreting
antibodies to measles virus
Nature, Vol. 288, 488-489

- 14 C.M. Croce, M. Shander, J. Martins, L. Cicurel,
E.G. D'Ancona, H. Koprowski (1980)
Preferential retention of human chromosome 14 in
mouse x human B cell hybrids
Eur. J. Immunol. 10, 486-488
- 15 P.A.W. Edwards, C.M. Smith, A.M. Neville,
M. O'Hare (1982)
A Human-Human Hybridoma System Based on a Fastgrowing
Mutant of the ARH-77 Plasma Cell Leukaemia-Derived Line
Eur. J. Immunol. Vol. 12, No. 8, 641-648
- 16 M.A. Epstein, B.G. Achon (1977)
Recent progress in Epstein-Barr virus research
Ann. Rev. Microbiol. 31, 421-445
- 17 Fazekas de St. Groth, D. Scheidegger (1980)
Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics
J. Immunol. Meth. 35, 1-21
- 18 E.F. Gale, E. Cundliffe, P.E. Reynolds, M.H. Richmond,
M.J. Warnin
Molecular Basis of Antibiotic Action
2nd ed. Wiley London 1981, 260-273
- 19 M.L. Geftter, D.H. Margulies, M.D. Scharff (1977)
A Simple Method for Polyethylene Glycol-Promoted
Hybridization of Mouse Myeloma Cells
Somatic Cell Genetics, Vol.3, No. 2, 231-236
- 20 J.G. Heitzmann, M. Cohn (1983)
The Wi-L2-729-HF₂ Human Hybridoma System
Stable Hybrids at High Frequency
Mo. Biol. Med. 1, 235-243

- 21 K.W. Hunter, V.G. Hemming, G.W. Fischer,
S.R. Wilson (1982)
Antibacterial activity of human monoclonal antibody
to haemophilus influenzae type B capsular polysaccharide
The Lancet, October 9, 1982, 798-799
- 22 R.F. Irie, P.C. Jones, D.L. Morton, N. Sidell (1981)
In vitro production of human antibody to a
tumour-associated foetal antigen
Br. J. Cancer, 44, 262-264
- 23 M.J. O'Hare, C.M. Smith, R.A.W. Edwards, in
H. Peeters (Hrsg.)
Protides in biological Fluids, Colloquium 30
Pergamon, Oxford, 1983, 265-268
- 24 N.N. Iscove, F. Melchers (1978)
Complete replacement of serum by albumin, transferrin,
and soybean lipid in cultures of lipopolysaccharide
reactive B lymphocytes
J. Exp. Med. 147, 923-933
- 25 E.T. Kenneth, J.W. Larrick, A.A. Raubitschek,
D.W. Buck, S.W. Jakobson (1984)
Production of human monoclonal antibody in
mouse ascites
Hybridoma Vol. 3, No. 2, 195-199
- 26 G. Köhler, C. Milstein (1976)
Derivation of specific antibody-producing tissue
culture and tumor lines by cell fusion
Eur. J. Immunol. 1976.6, 511-519
- 27 D. Kozbor, A.E. Larade, J.C. Roder (1982)
Human hybridomas constructed with antigen-specific
Epstein-Barr virus-transformed cell lines
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6651-6655

- 28 D. Kozbor, J.C. Roder (1983)
The production of monoclonal antibodies from
human lymphocytes
Immunology Today, Vol.4, No. 3, 72-79
- 29 D. Kozbor, J.C. Roder (1981)
Requirements for the establishment of high-titered
human monoclonal antibodies against tetanus toxoid
using the Epstein-Barr virus technique
J. Immunol. Vol. 127, No. 4, 1275-1280
- 30 U. Krohndahl, N. Bols, T. Ege, S. Linder,
N.R. Rinsert (1977)
Cells reconstituted from cell fragments of two
different species multiply and form colonies
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74.2, 606-609
- 31 P.C. Kung, E. Hornberger, E. Rosen, D.L. Dunn,
R.M. Ferguson (1982)
Human monoclonal antibodies against E. coli
Blood, Vol. 60, No. 5, Suppl. 1, 435
- 32 U.K. Lämmlí (1970)
Cleavage of Structural Proteins during the Assembly
of the Head of Bacteriophage T4
Nature 227, 680-685
- 33 H.C. Lane, J.H. Shelhamer, H.S. Mostowski,
A.S. Fauci (1982)
Human monoclonal anti-keyhole limpet hemocyanin
antibody-secreting hybridoma produced from peripheral
blood B lymphocytes of a keyhole limpet hemocyanin-
immune individual
J. Exp. Med. 155, 333-338

- 34 J.W. Larrick, K.E. Truitt, A.A. Raubitschek,
G. Senyk, J.C.N. Wang (1983)
Characterization of human hybridomas secreting
antibody to tetanus toxoid
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 6376-6380
- 35 J.A. Levy, M. Virolainen, V. Defendi (1968)
Human lymphoblastoid lines from lymph nodes and spleen
Cancer 22, 517-524
- 36 R. Levy, J. Dilley (1978)
Rescue of immunoglobulin secretion from human neoplastic
lymphoid cells by somatic cell hybridization
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 75, No. 5, 2411-2415
- 37 J.W. Littlefield (1964)
Selection of Hybrids from Matings of Fibroblasts
in vitro and Their Presumed Recombinants
Science 145, 709-710
- 38 R.A. Miller, D.G. Maloney, R. Warnke, R. Levy (1982)
Treatment of B-cell lymphoma with
monoclonal anti-idiotyp antibody
The New England Journal of Medicine
Vol. 306, No. 9, 517-522
- 39 J. Ohara, T. Sekiguchi, T. Watanabe (1981)
Purification of cytoplasts (enucleated cells)
and caryoplasts (nuclei) from mouse splenic
lymphocytes with cytochalasin-B
J. Immunol. Meth. 45, 239-248
- 40 L. Olsson, H.S. Kaplan (1980)
Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies
of predefined antigenetic specificity
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 77, No. 9, 5429-5431

- 41 L. Olsson, H. Kronström, A. Cambon-De-Mouzon,
C. Honsik, T. Brodin, B. Jakobsen (1983)
Antibody Producing Human-Human Hybridomas.
I Technical Aspects
- 42 J.W. Pickering, F.B. Gelder, (1982)
A human myeloma cell line that does not express
immunoglobulin but yields a high frequency of
antibody-secreting hybridomas
J. Immunol. Vol. 129, No. 1, 406-410
- 43 R.F. Pittillo, D.E. Hunt, in
D. Gottlieb, P.D. Shaw (Hrsr.)
Antibiotics Vol. 1: Mechanism of Action
Springer Verlag, Heidelberg 1976, 481-493
- 44 H.C. Reilly in
G.E.W. Wolstenholme, C.M. O'Connor (Hrsr.)
Ciba Foundation Symposium on amino acids and peptides
with antimetabolic activity
J. & A. Churchill Ltd. London 1958, 62-74
- 45 R.E. Ritts, A. Ruiz-Arquelles, K.G. Weyl, A.L. Bradley
B. Weihmeir, D.J. Jakobsen, L. Strehlo (1983)
Establishment and characterization of a human
non-secretory plasmacytoid cell line and its
hybridization with human B cells
Int. J. Cancer 31, 133-141
- 46 D.O. Schachtschabel, H. Lazarus, S. Faber,
G.E. Foley (1966)
Sensitivity of cultured human lymphoblasts
(CCRF-CEM cells) to inhibition by thymidine
Exp. Cell Res. 43, 512-514

- 47 J.S. Schlom, D. Wunderlich, Y.A. Teramoto (1980)
Generation of human monoclonal antibodies reactive
with human mammary carcinoma cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 77, No. 11, 6841-6845
- 48 J. Schwaber (1975)
Immunoglobulin production by a human-mouse
somatic cell hybrid
Exptl. Cell Res. 93, 343-354
- 49 Y. Shoenfeld, S.C. Hsu-Lin, J.E. Gabriels,
L.E. Silberstein, B.C. Furie, B. Furie,
B.D. Stollar, R.S. Schwartz (1982)
Production of Autoantibodies by Human-Human Hybridomas
J. Clin. Invest. Vol. 70, July, 205-208
- 50 Y. Shoenfeld, J. Rauch, H. Massicotte, S.K. Datta,
J. André-Schwartz, B.D. Stollar, R.S. Schwartz (1983)
Polyspecificity of monoclonal lupus autoantibodies
produced by human-human hybridomas
The New England Journal of Medicine
Vol. 308, No. 8, 414-420
- 51 K. Sikora, T. Alderson, J. Phillips, J.V. Watson (1981)
Human hybridomas from malignant gliomas
The Lancet, January 2, 1982, 11-14
- 52a. Sikora, J. Phillips (1981)
Human monoclonal antibodies to glioma cells
Br. J. Cancer 43, 106-107
- 53 M. Steinitz, N. Koido, G. Spira, S. Tamir, G. Klein (1983)
In Vitro Produced Monoclonal Rheumatoid Factor:
Purification, Radiolabel, and possible Applications
Cellular Immunology 69, 205-214

- 54 M. Steinitz, S. Tamir (1982)
Human monoclonal autoimmunantibody produced in vitro:
Rheumatoid factor generated by Epstein-Barr
virus-transformed cell line
Eur. J. Immunol. 1982.12, 126-133
- 55 L.E. Strike, B.H. Devens, R.L. Lundak (1984)
Production of human-human hybridomas secreting antibody
to sheep erythrocytes after in vitro immunization
J. Immunol. Vol. 132, No. 4, 1798-1803
- 56 R. Swoboda, A. Schimpl, E. Wecker (1979)
Stages of B-cell activation suitable for the
formation of Ig secreting hybridomas
Immunobiology Vol. 159 No. 1/2, 131
- 57 D.J. Volkman, S.P. Allyn, A.S. Fauci (1982)
Antigen-induced in-vitro antibody production in humans.
Tetanus toxoid specific antibody synthesis
J. Immunol. 129, 107
- 58 D.J. Volkman, H.C. Lane, S. Fauci (1981)
Antigen-induced in vitro antibody production in humans:
A model for B cell activation and immunoregulation
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2528-2531
- 59 H.M. Wahrenius, J.W. Taylor, B.E. Durack, P.A. Cross (1983)
The Production of Human Hybridomas from Patients
with Malignant Melanomas. The Effect of Pre-Stimulation
with Pokeweed Mitogen
Eur. J. Cancer Vol. 19, No. 3, 347-355
- 60 T. Watanabe, J. Ohara (1981)
Functional nuclei of LPS-nonresponder C3H/HeN mice
after transfer into LPS-responder C3H/HeN cells
by cell fusion
Nature 290, 58-59

61 W.E. Wright, (1978)

The isolation of heterocaryons and hybrids by a selective system using irreversible biochemical inhibitors

Exp. Cell Res. 112, 395-407

62 H.W.L. Ziegler-Heitbrock, C. Reiter, J. Trenkmann,
S. Küchle, G. Riethmüller (1984)

Human monoclonal antibodies against different epitopes
of the tetanus toxoid molecule

(in Vorbereitung)

Lebenslauf

Ich, Christian Reiter, wurde am 6. 7. 1959 in München geboren. Mein Vater Herbert Reiter ist Elektromeister, meine Mutter Maria Reiter, geborene Häfner, ist Hausfrau. Ich habe keine Geschwister.

Von 1965 bis 1969 besuchte ich die Grundschule in München und in Pullach im Isartal, anschließend den humanistischen Zweig des Staatlichen Gymnasiums Pullach. Die elfte Jahrgangsstufe konnte ich überspringen, und in der Kollegstufe wählte ich die Leistungskurse Mathematik und Physik. 1977 schloß ich die Schule mit der Abiturnote 1,3 ab.

Von November 1977 bis April 1984 studierte ich Humanmedizin an der Ludwig Maximilians Universität in München. 1980 famulierte ich am psychiatrischen Krankenhaus Eichberg in Eltville/Rhein, 1981 in der Kinderabteilung des Charles Johnson Memorial Hospital in Ngutu, Südafrika. Im praktischen Jahr wählte ich als freies Fach Psychiatrie im Bezirkskrankenhaus Haar. Im Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im April 1984 erhielt ich die Noten "gut" und "befriedigend" im schriftlichen und mündlichen Teil der Prüfung.

Die experimentellen Arbeiten zu meiner Dissertation führte ich von November 1981 bis Februar 1983 durch.

Christian Reiter

Herzlichen Dank

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie der Universität München für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Prof. Dr. C. Riethmüller weckte mein Interesse für diese Arbeit und ermöglichte mir am Projekt der humanen Fusion mitzuarbeiten.

Dr. H. W. L. Zierler-Heitbrock unterstützte und beriet mich wo immer er konnte. Ohne seine Zuversicht und seine Ermunterung hätte ich die großen Probleme während des ersten halben Jahres sicher nicht bewältigt. Bis zur Fertigstellung des Manuskriptes bewies er größte Geduld.

Fr. E. Petersmann zeigte mir die Techniken und Kniffe im Umgang mit Zellkulturen. Ihre außerordentliche Sorgfalt und Gewissenhaftigkeit machten die Zusammenarbeit sehr angenehm.

Frl. Agnes Fütterer, Frl. Christine Warenpfel und Frl. Irene Krebs waren stets zuvorkommende Kolleginnen und sorgten wesentlich für das gute Arbeitsklima.

Fr. Dr. J. Johnson half mir in vielen Diskussionen mit ihrer großen Erfahrung in der Maus Fusion und unterstützte mich mit ihren Mitarbeitern bei Internal Labeling Versuchen und Gelelektrophoresen.

Prof. Rieber und sein Mitarbeiter, Hr. Euren Kopp unterstützten mich bei der Immundiffusion.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meiner Freundin Fr. Gisela Franke für die Hilfe bei den Schreibarbeiten.

Besonderer Dank gebührt auch meinen Eltern. Mit ihrer großzügigen finanziellen Unterstützung konnte ich mich ein Jahr lang ganz auf diese Arbeit konzentrieren.

